

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局



(43) 国际公布日:

2004年6月17日(17.06.2004)

PCT

(10) 国际公布号:

WO 2004/050876 A1

(51) 国际分类号: C12N 15/62, 15/63, 15/33, A61K 39/385, A61P 25/28

Jianmin) [CN/CN]; 秦川(QIN, Chuan) [CN/CN]; 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2003/001019

(74) 代理人: 北京市中咨律师事务所(ZHONGZI LAW OFFICE); 中国北京市海淀区三里河路甲11号中国建材大厦C座5层, Beijing 100037 (CN)。

(22) 国际申请日: 2003年12月1日(01.12.2003)

(25) 申请语言: 中文

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权: 02154703.3 2002年11月29日(29.11.2002) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 本元正阳基因技术有限公司(AGTC GENE TECHNOLOGY COMPANY LTD.) [CN/CN]; 中国北京市经济技术开发区永昌中路6号, Beijing 100176 (CN)。中国医学科学院基础医学研究所(INSTITUTE OF BASIC MEDICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。中国医学科学院实验动物研究所(INSTITUTE OF LABORATORY ANIMALS, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市朝阳区潘家园南里5号, Beijing 100005 (CN)。

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:  
— 包括国际检索报告。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 吴小兵(WU, Xiaobing) [CN/CN]; 董小岩(DONG, Xiaoyan) [CN/CN]; 中国北京市经济技术开发区永昌中路6号, Beijing 100176 (CN)。何维(HE, Wei) [CN/CN]; 张建民(ZHANG,

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: A RECOMBINANT ADENOVIRUS RELATING GENE VACCINE USED TO THERAPY AND PREVENT ALZHEIMERS DISEASE, AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 用于治疗 and 预防阿尔茨海默病的重组腺相关病毒基因疫苗及其用途

(57) Abstract: The invention relates to a recombinant Adenovirus relating gene vaccine which can be used to therapy and prevent Alzheimers disease, and the using thereof. More carefully, the recombinant Adenovirus relating gene vaccine includes a recombinant DNA molecular, comprising a nucleic acid sequence which encoding a fusion protein, consisting of cholera toxin B subunit and amyloid  $\beta$  peptide fragment ( $A\beta$ ). The invention further relates to pharmaceutical compositions comprising the recombinant DNA molecular or the fusion protein.

(57) 摘要

本发明涉及一种用于阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的治疗和预防的重组腺相关病毒基因疫苗及其用途。更具体地, 本发明的重组腺相关病毒基因疫苗包含一种重组 DNA 分子, 该重组 DNA 分子含有编码一种霍乱毒素 B 亚单位和  $A\beta$  肽片段的融合蛋白的核酸序列。本发明还涉及包含所述重组 DNA 分子或融合蛋白的药物组合物。

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/050876 A1

IAP13 Rec'd PCT/PTO 12 DEC 2005

## 用于治疗 and 预防阿尔茨海默病的重组腺

### 相关病毒基因疫苗及其用途

#### 发明领域

本发明涉及一种用于阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的治疗和预防的重组腺相关病毒基因疫苗及其用途。更具体地, 本发明的重组腺相关病毒基因疫苗包含一种重组 DNA 分子, 该重组 DNA 分子含有编码一种霍乱毒素 B 亚单位和 A $\beta$ 肽片段的融合蛋白的核酸序列。本发明还涉及包含所述重组 DNA 分子或融合蛋白的药物组合物。

#### 背景技术

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 又称早老性痴呆 (Presenile dementia), 是一种常见的中枢神经系统进行性变性疾病, 其主要临床表现为进行性记忆减退和认知障碍。AD 的神经病理学特征为过度的细胞外  $\beta$  淀粉样蛋白沉淀、神经纤维缠结增多、突触密度减少、神经元细胞减少等。其中细胞外  $\beta$  淀粉样蛋白的沉积, 形成分散的老年斑和淀粉样血管病, 被认为是该病发病机制中的关键环节。  $\beta$  淀粉样蛋白 (amyloid  $\beta$  protein) 是由  $\beta$  淀粉样前体蛋白 ( $\beta$  amyloid precursor protein, APP) 经过  $\beta$ -分泌酶 (BACE) 和  $\gamma$ -分泌酶裂解后产生的含 39 ~ 43 个氨基酸残基的酶解片段。正常情况下, APP 大部分经过  $\alpha$ -分泌酶和  $\gamma$ -分泌酶裂解, 不形成 A $\beta$ 肽, 不能形成细胞外  $\beta$  淀粉样蛋白沉淀。AD 的发生与 APP 蛋白的几种突变体有关。如 APP<sup>V717I</sup> (Goate et al, Nature 349;704)、APP<sup>V717G</sup> (Harlan et al, Nature 353;844)、APP<sup>V717F</sup> (Murrell, Science 254;97)、APP 的赖氨酸<sup>595</sup>-甲硫氨酸<sup>596</sup> 变为天冬氨酸<sup>595</sup>-亮氨酸<sup>596</sup> 的双突变 (Mullan et al, Nature Genet., 1;345)。这些突变改变了 APP 的酶切位点, 使大部分 APP 经过  $\beta$ -分泌酶和  $\gamma$ -分泌酶裂解, 产生 39 ~ 43 个氨基酸残基的 A $\beta$ 肽, 形成细胞外  $\beta$  淀粉样蛋白聚集沉淀。特别是这些突变增加了 A $\beta$ <sub>42</sub> 肽和 A $\beta$ <sub>43</sub> 肽的产生量, 由于

A $\beta$ <sub>42</sub> 肽和 A $\beta$ <sub>43</sub> 肽羧基末端延伸部位的构象更难溶于水, 易于聚集形成反向平行的 $\beta$ 折叠片层优先沉淀(Joachim et al, Nature 325;733、Halverson et al, Biochemistry 29;2639、Barrow et al, J. Mol. Bio. 225;1075)。然而, A $\beta$ <sub>42</sub> 肽的聚集可以促进 A $\beta$ <sub>40</sub> 肽聚集, 从而形成老年斑。

APP 基因已被测序, 并定位于第 21 号染色体上(Kang et al, Nature 325;733)。APP 基因的表达产生几种 695, 751 和 770 个氨基酸的含有 A $\beta$  的异构体。(Kang et al, Nature 325;733、Kitaguchi et al, Nature 331;530)。虽然有证据表明 APP 具有介导神经元的粘连与生长的作用(Schubert et al, Neuron 3;689)以及在 G 蛋白质连接的信号传导途径中起作用(Nishimoto et al, Nature 362;75), 但是 APP 在神经系统中的确切功能还尚不清楚。

目前普遍认为,  $\beta$ 淀粉样蛋白的沉积在 AD 的发生发展过程中起关键性作用, 所有与该疾病相关的因素要么促进 $\beta$ 淀粉样蛋白的沉积, 要么强化由 $\beta$ 淀粉样蛋白引发的病理变化。因此, 目前研究人员开发用于治疗 AD 药物的主要靶位点是降低中枢神经系统(CNS)中 $\beta$ 淀粉样蛋白沉积的数量。此类研究主要分为两大领域, 即降低 $\beta$ 淀粉样蛋白的产生和增加它的清除。

对于第一个领域, 从药物学的角度来说, 降低 $\beta$ 淀粉样蛋白的产生的最直接的方式是通过直接抑制 $\beta$ 或 $\gamma$ 分泌酶。但是, 目前对 $\beta$ -分泌酶(BACE)和 $\gamma$ -分泌酶在人体内的其它功能尚未研究清楚, 而且它们存在于细胞的内质网或内体系统的内膜上, 现在还难以找到既能通过血脑屏障, 又能通过细胞膜和内质网膜的药物来抑制它们的酶活性的特异性抑制物。

对于第二个领域, 尤其对于已发展成为 AD 的病人来说, 清除脑组织内 $\beta$ 淀粉样蛋白的沉积更为重要。目前这一领域的研究比较热。其中, 专利申请 WO 98 / 44955 公开了使用特异于 $\beta$ -淀粉样蛋白末端的重组抗体防止或预防阿尔茨海默病的方法, 该专利申请保护的是特异于 $\beta$ -淀粉样蛋白末端的重组抗体和编码它们的 DNA 及其使用方法。WO 99 / 27944 公开了使用 A $\beta$ <sub>42</sub> 肽产生抗 $\beta$ 淀粉样蛋白的抗体, 该抗体能够通过血脑屏障进入脑组织与 $\beta$ 淀粉样蛋白结合, 并通过小神经胶质细胞的吞噬作用清除 $\beta$ 淀粉样

蛋白的沉积。该专利申请保护的是  $A\beta_{42}$  肽疫苗的制备及其使用方法。虽然该专利申请中提及到有关  $A\beta_{42}$  DNA 片段作为基因疫苗的潜在的可能性，但没有公开基因疫苗是如何在治疗中使用的具体内容。

虽然上述肽疫苗或抗体被动免疫较以往 AD 的治疗方法有了较大的突破，但是仍不够完善。首先， $A\beta_{42}$  肽分子较小，免疫原性低，为得到能清除老年斑的抗  $\beta$  淀粉样蛋白抗体，需要反复注射  $A\beta_{42}$  肽。采用长期的皮下免疫，操作繁琐，同时也给 AD 病人带来较大的痛苦。其次，采用被动免疫治疗方法给 AD 病人直接注射抗  $\beta$  淀粉样蛋白抗体，也存在着明显的缺点，即抗体在体内的半衰期非常短。不适用于象 AD 这类慢性疾病的治疗。再次，从目前所取得的实验结果来看，虽然疗效显著，但仍未达到最理想的程度，如特异性抗体的滴度仍不是很高，仍有部分老年斑形成等。因此，AD 的免疫治疗需要进一步改进。目前国际上 AD 免疫治疗的发展趋势是：（1）增强  $A\beta_{42}$  肽疫苗的免疫原性，进一步提高特异性抗体的滴度；（2）改进免疫途径和方法；（3）减少操作的复杂性和成本，便于大量制备，广泛使用。

## 发明内容

根据本发明的一个方面，提供了一种新的基因重组疫苗，该疫苗含有编码霍乱毒素 B 亚单位和  $A\beta$  肽片段的重组 DNA 序列或其衍生物，也含有与该重组 DNA 分子有效连接的并能够在真核细胞中表达融合蛋白（霍乱毒素 B 亚单位和  $A\beta$  肽片段）的启动子。同时，为了能够使融合蛋白顺利地从表达细胞中分泌出来，在重组 DNA 分子的 5' 端也提供了一个前导序列，编码 N-末端信号肽。编码霍乱毒素 B 亚单位和  $A\beta$  肽片段的融合蛋白核苷酸序列如图 4 和序列表（SEQIDNO.1）所示。

本发明的另一个方面是提供一种重组 DNA 分子，它含有编码一种霍乱毒素 B 亚单位和  $A\beta$  肽片段的融合蛋白的基因，该融合蛋白能够诱发机体产生抗  $\beta$  淀粉样蛋白抗体。

本发明的又一个方面是提供一种包含本发明的重组 DNA 分子的重组病毒载体, 该重组病毒载体编码能够有效诱导对 $\beta$ 淀粉样蛋白产生免疫应答的霍乱毒素 B 亚单位和 A $\beta$ 肽片段的融合蛋白, 用于将所述重组 DNA 分子导入机体细胞。适合的病毒载体包括腺相关病毒、腺病毒、疱疹病毒、逆转录病毒、痘苗病毒、禽痘病毒、新培斯病毒或鸡痘病毒。

本发明的另一方面是提供一种用于防止或抑制阿尔茨海默病的进一步发展的新的药物组合物。该药物组合物包含一种融合蛋白质, 称为 CB-A $\beta$  (序列表 SEQ IDNO.2)。该蛋白质 CB-A $\beta$ 由霍乱毒素 B 亚单位-接头-A $\beta$ 肽片段组成。在一些药物组合物中该蛋白质 CB-A $\beta$ 可以是重组 DNA 分子在原核细胞中表达产物, 也可以是真核细胞如酵母的表达产物。

应理解的是, 本发明的融合蛋白不仅限于由霍乱毒素 B 亚单位与 A $\beta$ 肽形成。在一些药物组合物中, 融合蛋白也可以是免疫球蛋白-接头-A $\beta$ 肽; 在一些药物组合物中, 融合蛋白也可以是改造的细菌毒素-接头-A $\beta$ 肽; 在一些药物组合物中, 融合蛋白也可以是 HBV 的 HBsAg-接头-A $\beta$ 肽; 在一些药物组合物中, 融合蛋白也可以是脂类或脂质体-A $\beta$ 肽。

本发明还提供了含编码融合蛋白(霍乱毒素 B 亚单位-接头-A $\beta$ 肽)的本发明的重组 DNA 分子及合适的基因转运载体的药物组合物。所述组合物适用于多种给药途径的, 用于防止或抑制阿尔茨海默病的进一步发展。该药物组合物的给药途径包括口服、鼻饲、皮内、皮下、肌内、局部或静脉内给药。

#### 附图简要说明

图 1 表示 $\beta$ 淀粉样蛋白产生的机制和 $\beta$ 淀粉样前体蛋白 (APP) 酶解的途径。 $\beta$ 淀粉样蛋白是由 $\beta$ 淀粉样前体蛋白 (APP) 经过 $\beta$ -分泌酶 (BACE) 和  $\gamma$ -分泌酶裂解后产生的肽片段。同时, 图 1 也显示了 APP 经 $\alpha$ -分泌酶和  $\gamma$ -分泌酶裂解后降解的过程。

图 2 表示在 APP 产生 $\beta$ 淀粉样蛋白区域的氨基酸序列。箭头表示 $\alpha$ -

$\beta$ -、或  $\gamma$ -分泌酶的切割位点。 $\beta$ 淀粉样蛋白是含 39~43 个氨基酸残基的肽片段。

图 3 表示基因重组疫苗的构建技术路线，主要包括 CB 和 A $\beta$ 42 DNA 的克隆、连接、测序、质粒载体的构建、病毒的包装与收获等过程。具体内容参照实施例 1。

图 4 表示基因重组 DNA 分子中编码融合蛋白的 DNA 序列，共含有 510 个核苷酸组成。

图 5 表示基因重组 DNA 分子表达产物-融合蛋白的氨基酸序列，由 170 个氨基酸残基组成。

图 6 表示基因重组免疫疫苗免疫 PDAPP 转基因小鼠和非转基因小鼠后外周血抗 $\beta$ 淀粉样蛋白抗体的效价。(A) 治疗组 PDAPP 转基因小鼠；(B) 预防组 PDAPP 转基因小鼠；(C) 治疗组非转基因小鼠；(D) 预防组非转基因小鼠。

图 7 表示血清抗 A $\beta$  IgG 抗体的中和作用，在 rAAV/CB-A $\beta$ <sub>42</sub> 免疫血清 1:10 稀释度时，能够部分中和 A $\beta$ <sub>42</sub> 的神经毒性作用。

图 8 表示治疗组 PDAPP 转基因小鼠在水迷宫实验中 1~6 天搜索隐蔽平台的平均潜伏期 (Mean $\pm$ SEM)。A. 非处理组和 AAV/GFP 组。B. rAAV/A $\beta$ <sub>42</sub> 组。C. rAAV/CB-A $\beta$ <sub>42</sub> 组。其中 im 表示肌肉注射，in 表示鼻饲，oral 表示灌胃（以下各图相同）。

图 9 表示预防组 PDAPP 转基因小鼠在水迷宫实验中 1~6 天搜索隐蔽平台的平均潜伏期 (Mean $\pm$ SEM)。A. 非处理组和 AAV-GFP 组。B. AAV-CB-A $\beta$ <sub>42</sub> 三种免疫途径。

图 10 表示治疗组(A)和预防组(B)中各组 PDAPP 转基因小鼠在探索实验中在 TQ 象限中搜索时间的所占百分比。\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ ，与非治疗组或 AAV-GFP 组相比较。

图 11 表示治疗组(A)和预防组(B)各组小鼠在探索实验中在 30 秒内经过平台位置的次数。

图 12 表示治疗组 PDAPP 转基因小鼠在可见平台水迷宫试验中的平均潜伏期 (Mean $\pm$ SEM)。A. 非处理组和 AAV/GFP 组。B. rAAV/CB-A $\beta$ <sub>42</sub> 组。C. rAAV/A $\beta$ <sub>42</sub> 组。

图 13 表示预防组 PDAPP 转基因小鼠在可见平台水迷宫试验中的平均潜伏期 (Mean $\pm$ SEM)。A. 非处理组和 AAV/GFP 组。B. rAAV/CB-A $\beta$ <sub>42</sub> 组。

图 14. 治疗组 PDAPP 转基因小鼠脑组织内 A $\beta$ 淀粉样蛋白免疫组织化学检测 (大脑皮层)。A. Control. B. rAAV/ A $\beta$ 42 肌注组 C. rAAV/ CB-A $\beta$ 42 肌注组。

图 15. 治疗组 PDAPP 转基因小鼠脑组织内 A $\beta$ 淀粉样蛋白免疫组织化学检测 (海马区域)。A. Control. B. rAAV/ A $\beta$ 42 肌注组 C. rAAV/ CB-A $\beta$ 42 肌注组。

图 16. 预防组 PDAPP 转基因小鼠脑组织内 A $\beta$ 淀粉样蛋白免疫组织化学检测 (大脑皮层)。A. Control. B. rAAV/ GFP 肌注组 C. rAAV/CB-A $\beta$ 42 肌注组。

图 17. 预防组 PDAPP 转基因小鼠脑组织内 A $\beta$ 淀粉样蛋白免疫组织化学检测 (海马区域)。A. Control. B. rAAV/ GFP 肌注组 C. rAAV/CB-A $\beta$ 42 肌注组。

图 18. 治疗组 PDAPP 转基因小鼠脑组织刚果红组织化学检测 (大脑皮层)。A. Control. B. rAAV/ A $\beta$ 42 肌注组 C. rAAV/ CB-A $\beta$ 42 肌注组。

图 19. 治疗组 PDAPP 转基因小鼠脑组织刚果红组织化学检测 (海马区域)。A. Control. B. rAAV/ A $\beta$ 42 肌注组 C. rAAV/ CB-A $\beta$ 42 肌注组。

图 20. 预防组 PDAPP 转基因小鼠脑组织刚果红组织化学检测 (大脑皮层)。A. Control. B. rAAV/ A $\beta$ 42 肌注组。C. rAAV/ CB-A $\beta$ 42 肌注组。

图 21. 预防组 PDAPP 转基因小鼠脑组织刚果红组织化学检测 (海马区域)。A. Control. B. rAAV/ A $\beta$ 42 肌注组。C. rAAV/ CB-A $\beta$ 42 肌注组。

图 22. 治疗组 PDAPP 转基因小鼠脑组织 GFAP (Glial fibrillary acidic

protein 神经胶质元纤维酸性蛋白) 免疫组织化学检测。A. Control. B. rAAV/ A $\beta$ 42 肌注组 C. rAAV/ CB-A $\beta$ 42 肌注组。

图 23. 预防组 PDAPP 转基因小鼠脑组织 GFAP 免疫组织化学检测。  
A. Control. B. rAAV/ A $\beta$ 42 肌注组 C. rAAV/ CB-A $\beta$ 42 肌注组。

### 具体实施方案

本发明的基因重组疫苗可以用于预防和治疗阿尔茨海默病(有 A $\beta$ 淀粉样蛋白沉积特征疾病)。本发明的重组 DNA 分子可以表达一种多肽如霍乱毒素 B 亚单位-接头-A $\beta$ 肽,是指它含有转录和翻译调节信息的核苷酸序列,并且这种序列是有效地与编码这种多肽的核苷酸序列连接的。有效连接是指这样一种连接,即调节 DNA 序列和表达基因 DNA 序列的连接方式可以引起基因的表达。总之,基因表达所需要的调节区域包括一种启动子区域和一种 DNA 序列,该序列当被转录成 RNA 时,将成为蛋白质合成的起始信号。这种区域将通常包括那些参与转录和翻译的 5'-非编码序列。在本发明的一个实施方案中,所用启动子例如是 CMV 启动子,该启动子适用于多种细胞,可以在多种细胞内促使目的基因的表达。

为了能够将带有编码霍乱毒素 B 亚单位和 A $\beta$ 肽片段的本发明的重组 DNA 分子导入患者体内,需要不同的用于基因转运的载体,与该重组 DNA 分子组合使用。用于基因转运的载体包括病毒载体(如腺相关病毒载体),脂类/脂质体,细胞表面受体的配体等。该重组 DNA 分子需要与基因转运载体组合在一起,例如一些病毒载体中的基因转运载体与编码融合蛋白的重组 DNA 分子被整合到病毒载体的 DNA 中或包装到病毒颗粒中;一些脂类或脂质体基因转运载体可以将重组 DNA 分子包裹在其中;一些细胞表面受体的配体作为基因转运载体与重组 DNA 分子以偶联或其它方式结合。因此,术语“组合”包括整合或包装、复合、偶联等方式。

腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)最初是在组织培养的污染



物中分离出来的，后来发现在儿童感染腺病毒发作期分离到一种非致病性共感染因子 (Blacklow et al, 1986)，称其为腺相关病毒或腺病毒伴随病毒。AAV 是一种细小病毒属的单链 DNA 病毒，具有 4.7kb 基因组。AAV 是一种复制缺陷型病毒，需要辅助病毒（通常为腺病毒或疱疹病毒）共感染才能进行有效的复制，完成其生命周期。在缺乏辅助病毒感染的情况下，AAV 变成潜伏的形式，并以高频率进行稳定的整合，通常是在第 19 号染色体的特定位点 (Kotin et al, 1992)。AAV 基因组已被测序，发现对于 AAV 整合所必须的、唯一的序列是 145 个核苷酸的反向末端重复序列 (ITR)。AAV 的克隆容量大约为 4.7Kb (Muzyczka, 1992)。由于该病毒具有自身的优越特点（非致病性、广泛的宿主细胞、高效的整合能力、耐热、耐酸、可以长期高效表达）使其特别适合用作基因转运载体。

利用 AAV 包装的重组 DNA 分子，一旦转运到患者体内，AAV 即可感染细胞并整合到细胞染色体上，表达融合蛋白（霍乱毒素 B 亚单位-接头-A $\beta$  肽），并分泌到细胞外，被抗原呈递细胞所识别、吞噬、处理和抗原呈递作用，将抗原呈递给 T 和 B 淋巴细胞，诱发机体免疫应答，产生抗 $\beta$ 淀粉样蛋白抗体。该抗体能够进入脑组织内的神经元细胞外环境，与可溶性或聚集的 $\beta$ 淀粉样蛋白结合，形成 $\beta$ 淀粉样蛋白-抗体复合物。在脑组织内抗体通过小神经胶质细胞表面 Fc 受体的调理作用促进其吞噬 $\beta$ 淀粉样蛋白-抗体复合物，以清除 $\beta$ 淀粉样蛋白的沉积，或者 $\beta$ 淀粉样蛋白-抗体复合物通过上矢状窦蛛网膜绒毛的排泄作用被清除出中枢神经系统，从而避免了 $\beta$ 淀粉样蛋白在脑组织内的沉积和由它诱发的神经毒性作用。

本发明的基因重组疫苗和药物组合物不仅适用于已经明显发展成具有阿尔茨海默病病理特征的患者，而且适用于普通人群预防阿尔茨海默病的发生，使普通人群获得对这种流行性而具有破坏力的疾病免疫力，特别是患有唐氏综合征 (Down's syndrome) 的患者或具有家族性阿尔茨海默病相关基因突变易于发展成阿尔茨海默病的人群。最佳施药途径是皮下、皮内、肌肉、口服、鼻饲或静脉。

与基因转运载体组合在一起的含有融合蛋白基因的重组 DNA 分子可被用于生产或制备药物组合物, 这种药物组合物包含所需要的有效量的重组 DNA 分子。例如, 基因转运载体是 AAV 载体时, 用于治疗或预防阿尔茨海默病的药物组合物中病毒颗粒的适当剂量大约为  $5 \times 10^4$  至  $1 \times 10^{12}$  个病毒颗粒。当以一种细胞表面受体的配体作为基因转运载体时, 所使用的配体结合的 DNA 分子的量大约为  $0.5 \sim 100 \mu\text{g}$ 。如果以脂类或脂质体作为基因转运载体时, 所使用的 DNA 分子的量大约为  $1 \sim 500 \mu\text{g}$ 。

在本发明中, 所使用的术语定义如下:

术语“PDAPP 转基因小鼠”是指转染了  $\text{APP}^{\text{V717I}}$  基因突变体的 C57 小鼠, 该小鼠在 3~5 个月时就开始有行为学改变, 在 11~13 个月时脑组织内出现类似阿尔茨海默病病人的病理改变, 有明显的淀粉样蛋白的沉积, 老年斑的沉积。

术语“非转基因小鼠”是指未转染  $\text{APP}^{\text{V717I}}$  基因突变体的 C57 正常小鼠。

术语“ $\text{APP}^{\text{V717I}}$ 、 $\text{APP}^{\text{V717G}}$  和  $\text{APP}^{\text{V717F}}$ ”分别指由人 APP 基因编码的 APP 蛋白的 717 位点由原来的缬氨酸突变为异亮氨酸、甘氨酸和苯丙氨酸。

术语“A $\beta$ 肽”是指含氨基酸残基 1-39、1-40、1-41、1-42 和 1-43 的 A $\beta$  肽片段, 主要包括 A $\beta_{39}$ 、A $\beta_{40}$ 、A $\beta_{41}$ 、A $\beta_{42}$  和 A $\beta_{43}$ 。“A $\beta$ 肽”也包括 A $\beta_{39}$ 、A $\beta_{40}$ 、A $\beta_{41}$ 、A $\beta_{42}$  和 A $\beta_{43}$  的衍生物。A $\beta_{41}$ 、A $\beta_{40}$  和 A $\beta_{39}$  与 A $\beta_{42}$  的不同之处在于, 它们分别缺失 C-末端的 Ala、Ala-Ile 和 Ala-Ile-Val。A $\beta_{43}$  与 A $\beta_{42}$  的不同之处是它在 C-末端加了一个 Thr。

术语“ $\beta$  淀粉样蛋白 (amyloid  $\beta$  protein)”在意思上等同于术语“A $\beta$  肽”, 包括 A $\beta_{39}$ 、A $\beta_{40}$ 、A $\beta_{41}$ 、A $\beta_{42}$  和 A $\beta_{43}$  肽。

术语“免疫应答”是指在接受治疗的患者体内产生对抗  $\beta$  淀粉样蛋白抗体和 / 或 A $\beta$  特异性 T 细胞或其分泌产物的应答。

术语“佐剂”指当与抗原结合使用时能够增强机体对抗原的免疫应答, 但是当单独使用时不产生对抗原的免疫应答的物质。佐剂可以通过几种机制增强免疫应答, 包括聚集淋巴细胞、激活 B 细胞和 / 或 T 细胞、激活巨

噬细胞。

术语“患者”包括接受预防性或治疗性处理的人和其他哺乳动物受试者。

术语“融合蛋白”在本文中是指含一种新的融合蛋白质，称为 CB-A $\beta$ 。该新的蛋白质 (CB-A $\beta$ ) 由霍乱毒素 B 亚单位-接头-A $\beta$ 肽片段组成。在一个优选的实施方案中，所述接头氨基酸序列为甘氨酸-脯氨酸-甘氨酸-脯氨酸。

术语“重组 DNA 分子”是指含有编码霍乱毒素 B 亚单位和 A $\beta$ 肽片段的核苷酸序列及其衍生物。

术语“衍生物”是指含有编码基本上保持人  $\beta$  淀粉样蛋白生物学功能或活性多肽的核苷酸序列。或者是指基本上保持人  $\beta$  淀粉样蛋白生物学功能或活性的多肽。

术语“启动子序列”是指 DNA 分子可以与 RNA 聚合酶特异结合的部位，也就是使转录开始的部位。

术语“基因转运载体”是指任何一种适用于将 DNA 分子的导入体内的技术和 / 或物质。

本发明的 AAV 基因重组疫苗在给予患者后，其在患者体内异位表达一种融合蛋白分子，诱发机体产生抗  $\beta$  淀粉样蛋白的抗体，该抗体能够进入脑组织内的神经元细胞外环境，与可溶性或聚集的  $\beta$  淀粉样蛋白结合，形成  $\beta$  淀粉样蛋白-抗体复合物。在脑组织内抗体通过小神经胶质细胞表面 Fc 受体的调理作用促进其吞噬  $\beta$  淀粉样蛋白-抗体复合物，以清除  $\beta$  淀粉样蛋白的沉积，或者  $\beta$  淀粉样蛋白-抗体复合物通过上矢状窦蛛网膜绒毛的排泄作用被清除出中枢神经系统，从而避免了  $\beta$  淀粉样蛋白在脑组织内的沉积和由它诱发的神经毒性作用。与阿尔茨海默病的病理过程中有关的淀粉样蛋白，即 A $\beta$ <sub>39</sub>、A $\beta$ <sub>40</sub>、A $\beta$ <sub>41</sub>、A $\beta$ <sub>42</sub> 和 A $\beta$ <sub>43</sub> 是主要清除目标。由此，本发明的基因重组疫苗可用于预防或治疗阿尔茨海默病，或者用于抑制阿尔茨海默病进一步发展。

利用本发明的基因重组疫苗或药物组合物，可以防止或清除  $\beta$  淀粉样蛋

白在神经元细胞外环境中的沉积，从而防止神经元的损害与丢失，并以此作为预防或治疗阿尔茨海默病的关键点。本发明也避免了长期重复使用需要穿越血脑屏障的药物制剂所带来的问题。另外，实验表明，本发明的融合蛋白的结构的设计，和接头的选择使得由接头连接的两个多肽在体内保持各自的活性，从而为本发明基因重组疫苗及融合蛋白预付或治疗阿尔茨海默病提供了保证。

通过参阅下述实施例可以更容易地了解本发明的内容，这些实施例只是为进一步说明，并不意味着限定本发明的范围。

### 实施例 1

#### 基因重组疫苗的构建

基因重组疫苗的构建技术路线如图 3 所示。首先，通过聚合酶链反应 (PCR) 将 A $\beta$  42 DNA 片段从人脑组织 cDNA 文库，中克隆出来，扩增引物为：

上游引物：5'-GGTCCTGGTCCTGATGCAGAATTCCGACATG AC-3'  
(SEQIDNO.3)，

下游引物：5'-GGAAGATCTTTACTACGCTATGACAACACCGCCCC-3'  
(SEQIDNO.4)。通过 RT-PCR 技术将霍乱毒素 B 亚单位 (CB) 的基因克隆出来，扩增引物为：

上游：5'-CCGGGGGTACCCACCATGATTAAATTAAAATTTGGTG -3'  
(SEQIDNO.5)，

下游：5'-CTGCATCAGGACCAGGACCATTGTCCTACTAATTGCG-3'  
(SEQIDNO.6)。

然后利用重叠 PCR 技术将 CB 与 A $\beta$  42 DNA 连接起来，中间加一段接头 DNA (序列为 GGTCCTGGTCCT, SEQ ID NO.7)。该接头 DNA 编码一段柔性的氨基酸短链，使表达出来的霍乱毒素 B 亚单位 (CB) 和 A $\beta$  42

肽片段可以维持各自的生物学活性。将 CB-A  $\beta_{42}$  基因片段装入 pGEM-T Easy 质粒 (Promega 公司生产) 后测序。测序结果如图 4 所示。将带有 CB-A  $\beta_{42}$  DNA 片段的 pGEM-T Easy 质粒以 Kpn I 和 Bgl II 双酶切后, 回收含 CB-A  $\beta_{42}$  DNA 片段; 同时, 将通用型 AAV 质粒载体 pSNAV (中国专利申请号: 99119038.6, 发明名称: 系列通用型腺病毒伴随病毒载体的构建及用途, 公开号: CN 1252450A), 以 Kpn I 和 Bgl II 双酶切后, 回收大片段, 得到含有粘性末端的 pSNAV 载体片段。将酶切后的 pSNAV 载体片段与含 CB-A  $\beta_{42}$  DNA 片段连接成 pSNAV-CB-A  $\beta_{42}$  质粒。然后, 进行连接产物的转化、小量提取纯化质粒 DNA。

同时构建了 pSNAV-A  $\beta_{42}$  质粒, 并将 pSNAV-A  $\beta_{42}$  质粒和 pSNAV-GFP 质粒作为 pSNAV-CB-A  $\beta_{42}$  质粒的对照。pSNAV-GFP 质粒为吴小兵等先前构建 (中国专利申请号: 99119038.6, 发明名称: 系列通用型腺病毒伴随病毒载体的构建及用途)。pSNAV-A  $\beta_{42}$  质粒中仅含有 A  $\beta_{42}$  DNA 片段, 并在其前面加了一个 AAP 的前导序列, 但不含 CB 基因 DNA 片段。pSNAV-GFP 质粒中插入了绿色荧光蛋白 (GFP) 基因。

## 实施例 2

### rAAV/CB-A $\beta_{42}$ 病毒的包装及其滴度的测定

将上述实施例 1 获得的 pSNAV-CB-A  $\beta_{42}$  质粒包装成含有 CB-A  $\beta_{42}$  表达盒的重组 AAV 病毒 (rAAV/CB-A  $\beta_{42}$  病毒), 即本发明的基因重组疫苗, 采用的是吴小兵等所申请的专利的方法 (中国专利申请号: 98120033.8, 发明名称: 用于重组腺伴随病毒生产的全功能辅助病毒的产生及其用途; 中国专利申请号: 99119039.4, 发明名称: 可用于大规模生产的重组腺病毒伴随病毒生产方法及用途; 中国专利申请号: 99123723.4, 发明名称: 一种快速高效分离和纯化重组腺病毒相关病毒的方法和用途)。具体步骤如下:

#### 步骤 1. rAAV/CB-A $\beta_{42}$ 病毒载体细胞株的建立

用 pSNAV-CB-A  $\beta_{42}$  质粒转染 BHK 细胞经选择培养得到 rAAV/CB-A  $\beta_{42}$  病毒载体细胞株 BHK/pSNAV-CB-A  $\beta_{42}$ 。

BHK 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液 37℃ 培养。将 pSNAV-CB-A  $\beta_{42}$  质粒用脂质体 lipofectamine (GIBCO BRL) 转染 BHK 细胞, 24hr 后消化, 1:2~5 传代。加 G418 800  $\mu$ g/ml 选择培养。10 天后可形成明显抗性细胞克隆。将细胞克隆挑出继续培养并进行冻存保种。用全功能辅助病毒 HSV1-rc (中国专利申请号: 98120033.8, 发明名称: 用于重组腺伴随病毒生产的全功能辅助病毒的产生及其用途) 感染所获得的克隆化培养的病毒载体细胞, 待细胞出毒后收获细胞及其培养液, SDS-PAGE 电泳检测结果显示 AAV 病毒的三条特征性电泳带, Southern 杂交结果显示该 rAAV 病毒包含有 CB-A  $\beta_{42}$  核酸序列, 该 rAAV 病毒是 rAAV/CB-A  $\beta_{42}$  病毒。测定 rAAV/CB-A  $\beta_{42}$  病毒的滴度。挑选出 rAAV 病毒滴度高的细胞株作为 AAV-GFP 病毒载体细胞株。

#### 步骤 2. 制备重组 rAAV/ CB-A $\beta_{42}$ 病毒

将上述获得的克隆化培养的病毒载体细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液继续于 37℃ 培养至大量滚瓶培养规模, 在细胞达到一定数量后, 用全功能辅助病毒 HSV1-rc 感染扩大培养的细胞。待细胞出毒后收获细胞及其培养液, 采用下述步骤进行重组 rAAV/ CB-A  $\beta_{42}$  病毒的分离和纯化: 1) 氯仿破碎细胞、灭活 HSV 辅助病毒及使大量细胞蛋白变性沉淀; 2) 用 DNaseI 和 RNase 处理细胞裂解液以降解核酸; 3) 加 NaCl 促使 rAAV 与细胞碎片分离, 离心去除细胞碎片; 4) 用 PEG/NaCl 沉淀 rAAV; 5) 用氯仿抽提去除杂蛋白和残余的 PEG; 6) 透析除盐; 7) 用密度梯度离心法或亲和层析法进一步纯化 rAAV。

rAAV/ CB-A  $\beta_{42}$  病毒的滴度测定: 以 Roche 公司地高辛 DNA 标记和检测试剂盒 (Cat.No.1093657) 的方法进行, 以系列稀释的质粒 pSNAV-CB-A  $\beta_{42}$  质粒为标准对照, 进行 southern 杂交, 将样品的杂交信号与标准对照进行比较、定量。结果显示该 rAAV 病毒包含有 CB-A  $\beta_{42}$

核酸序列。rAAV 病毒的滴度为  $2 \times 10^{12-13}$  病毒颗粒/ml。

rAAV/CB-A $\beta_{42}$  病毒的电泳纯度测定：采用 SDS-PAGE 法，加样量为 5  $\mu$ g，电泳后凝胶进行考马斯亮蓝染色，见 AAV-2 外壳蛋白 VP1、VP2、VP3 三条主带，用扫描仪扫描后计算 VP1、VP2、VP3 蛋白总量占总蛋白量的百分比。结果显示 AAV 病毒的三条特征性电泳带。

rAAV/A $\beta_{42}$  病毒的包装及其滴度的测定方法与 rAAV/CB-A $\beta_{42}$  病毒相同。

### 实施例 3

#### 外周血 A $\beta$ 特异性 IgG 抗体滴度检测

将包装好的病毒分别通过口服、鼻饲和肌肉注射，免疫 1 月龄和 11 月龄 PDAPP 转基因小鼠 (PDAPP<sup>V717I</sup> 转基因小鼠，参见文献：秦川，常洋等。阿尔茨海默病转基因动物模型的建立。解剖学报；2000；31(2)：144-147) 和 C57 非转基因小鼠。在免疫后 1、2、5、12 个月，采集小鼠外周血，分离血清。采用 ELISA 方法检测血清中抗 A $\beta$  抗体的滴度。如图 6 所示，rAAV/CB-A $\beta_{42}$  免疫小鼠无论在治疗组还是预防组，无论是在转基因小鼠还是在非转基因小鼠，均能够产生高滴度的抗 A $\beta$  IgG 抗体，在免疫 2 个月时，血清中抗 A $\beta$  IgG 抗体的滴度最高（抗体的滴度在 5,000-15,000 之间，相当于 10 倍 rAAV/A $\beta_{42}$  免疫相应小鼠产生的抗体滴度）。在治疗组免疫 5 个月和预防组免疫 12 个月后，仍然能够检测到高滴度的抗 A $\beta$  IgG 抗体；rAAV-A $\beta_{42}$  免疫转基因小鼠后仅仅产生非常低的抗 A $\beta$  IgG 抗体（抗体的滴度在 200-500 之间）；rAAV/CB-A $\beta_{42}$  在免疫转基因小鼠与非转基因小鼠之间没有明显的差异，而 rAAV-A $\beta_{42}$  免疫非转基因小鼠后产生抗 A $\beta$  IgG 抗体的滴度明显高于转基因小鼠组 ( $P < 0.05$ )；rAAV-GFP 免疫组和非处理组外周血清中无论在转基因小鼠还是在非转基因小鼠均未检测到抗 A $\beta$  IgG 抗体（抗体滴度低于 1:64）。另外还发现，rAAV/CB-A $\beta_{42}$  免疫小鼠的三种途径之间抗体产生的滴度有所不同，肌肉注射组在第一、

二个月时，抗体的滴度明显高于灌胃组和鼻饲组，而灌胃组与鼻饲组之间无明显差异。rAAV/CB-A $\beta_{42}$ 免疫小鼠，治疗组外周血中抗 A $\beta$  IgG 抗体的滴度低于预防组 ( $P<0.05$ )。

#### 实施例 4

血清抗 A $\beta$  IgG 抗体对 A $\beta$  介导的神经细胞毒性作用的中和作用

将 SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞(购买于中国协和医科大学细胞中心)按每孔 100  $\mu$ l 含  $10^4$  个细胞接种于 96 孔板中，培养基为无血清培养基 DMEM/F12 (购于美国 Gibicol 公司)。将 A $\beta_{42}$  肽(美国 Sigma 公司)稀释成 0.12  $\mu$ M，37  $^{\circ}$ C 孵育 1 周，使其产生纤维丝。然后，按 10: 1 和 50: 1 与免疫血清混匀，7  $^{\circ}$ C 孵育 24h。同时，以非免疫血清做对照。每一样本做双复孔。将这种反应混合物加到含 SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞的培养孔中，37  $^{\circ}$ C，孵育 2 天。细胞的存活率采用 MTT 实验检测。每孔加入 15 $\mu$ l 的 5mg/ml 的 MTT，37 $^{\circ}$ C 孵育 4 小时。小心吸出培养上清，每孔加入 DMSO 200 $\mu$ l，用移液枪充分吹打。在全自动酶标仪(美国宝生物公司生产)上，使用检测波长 570nm 测定光密度 (OD.) 值。

检测结果显示，rAAV/CB-A $\beta_{42}$ 免疫小鼠的血清能够部分中和 A $\beta_{42}$  介导的对 SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞的神经毒性作用。如图 7 所示，在 rAAV/CB-A $\beta_{42}$ 免疫血清 1: 10 稀释度时，能够部分中和 A $\beta_{42}$  的神经毒性作用 (70% 的细胞存活率)，在 1: 50 稀释度时，则无明显中和 A $\beta_{42}$  神经毒性的作用。而非免疫血清则无明显作用。

#### 实施例 5

免疫小鼠的行为学检测 (水迷宫实验)

##### (1) 隐蔽平台实验 (Hidden water maze)

为了研究 rAAV/CB-A $\beta_{42}$  基因重组疫苗对 PDAPP 转基因小鼠认知和记忆力的改善作用，首先采用 Morris 水迷宫隐蔽平台实验评价各组小鼠



的学习和记忆能力 (Morris RGM. 1981)。在实验过程中, 记录了小鼠搜索隐蔽平台的潜伏期、搜索距离和速度。经分析各组小鼠之间的搜索速度无显著性差异, 潜伏期与搜索距离之间具有非常明显的相关性, 所以, 以小鼠搜索平台的潜伏期作为评价小鼠空间学习和记忆能力的指标。如图 8 所示, 治疗组在 6 天的训练过程中, 尽管各组小鼠搜索平台的潜伏期之间的存在差异, 但是潜伏期均有明显的缩短。采用 post hoc 分析各组的平均潜伏期发现 rAAV/CB-A $\beta_{42}$  免疫 PDAPP 转基因小鼠的三种免疫途径之间没有明显的差异 ( $p>0.05$ ), 同样 rAAV/A $\beta_{42}$  在三种免疫途径之间也没有明显的差异 ( $p>0.05$ )。因此, 我们以 rAAV/CB-A $\beta_{42}$  肌肉注射免疫组与 rAAV/A $\beta_{42}$  肌肉注射免疫组、rAAV-GFP 肌肉注射组和非处理组进行统计学分析, 结果显示 rAAV/CB-A $\beta_{42}$  肌肉注射免疫 PDAPP 转基因小鼠组的平均潜伏期在第 5~6 天时明显短于 rAAV/GFP 组 ( $p<0.01$ ) 和非处理组 ( $p<0.01$ )。而 rAAV/A $\beta_{42}$  免疫转基因小鼠组的潜伏期在 6 天内与 AAV-GFP 组 ( $p>0.05$ ) 和非处理组 ( $p>0.05$ ) 均无明显的差异。同样在第 5~6 天时, rAAV/CB-A $\beta_{42}$  免疫 PDAPP 转基因小鼠组的平均潜伏期 (24.2s) 与 rAAV/A $\beta_{42}$  组 (30.5s) 也有明显的差异 ( $p<0.05$ )。各组非转基因小鼠之间在实验 1~6 天均无明显的差异。

为了进一步研究 rAAV/CB-A $\beta_{42}$  基因重组疫苗是否能够对 PDAPP 转基因小鼠的认知和记忆损伤有预防作用, 将 rAAV/CB-A $\beta_{42}$  基因重组疫苗用于 1 月龄小鼠, 在第 12 个月后观察小鼠行为学指标。由于 rAAV/A $\beta_{42}$  基因重组疫苗在预实验中发现 PDAPP 转基因小鼠体内产生抗 A $\beta$  抗体的滴度非常低, 而且该疫苗在治疗组对转基因小鼠的行为学无明显的改善, 所以我们在预防组没有加入 rAAV/A $\beta_{42}$  组。

在预防组, 如图 9 所示, 我们发现在第 6 天时 rAAV/CB-A $\beta_{42}$  免疫 PDAPP 转基因小鼠的平均潜伏期明显比 rAAV/GFP 组 ( $p<0.05$ ) 和非处理组 ( $p<0.05$ ) 缩短。各组非转基因小鼠之间在实验 1~6 天均无明显的差异 ( $p>0.05$ )。

## (2) 探索实验 (Probe test)

由于小鼠在搜索隐蔽平台过程中,可能有小鼠偶尔、无意识或随机的碰到平台后上台的,为了消除这种随机性,我们将平台从水池中拿走,让小鼠在水池内搜索平台 60 秒,观察小鼠在原来含有平台的象限 (Target quadrant, TQ) 中的搜索时间和经过平台位置次数,通过比较在 TQ 象限中搜索时间的百分比和经过平台的次数,评价小鼠空间学习和记忆能力。同时,考虑到小鼠可能由于在平台位置搜索不到平台而影响小鼠后面的行为,所以,我们统计前 30 秒小鼠在 TQ 象限中的搜索时间和经过平台位置次数作为评价小鼠空间学习和记忆能力的指标。

探索实验结果显示,在治疗组, rAAV/CB-A  $\beta_{42}$  免疫小鼠的学习和记忆努力得到明显的改善,而 rAAV/A  $\beta_{42}$  免疫小鼠的空间学习和记忆能力与 rAAV/GFP 组和非处理组之间没有明显的差异。如图 10.A 所示, rAAV/CB-A  $\beta_{42}$  免疫小鼠 30 秒内在 TQ 象限中搜索时间的百分比明显高于 AAV-GFP 组、非处理组和 rAAV/A  $\beta_{42}$  组。rAAV/CB-A  $\beta_{42}$  肌注免疫小鼠在 TQ 象限中搜索时间的百分比为 37.5%, 而 rAAV/GFP 组为 27.2%, 非处理组 25.9%。AAV-GFP 组和非处理组与 rAAV/CB-A  $\beta_{42}$  肌注免疫组之间均有明显的差异 ( $p < 0.05$ )。rAAV-A  $\beta_{42}$  肌注免疫小鼠在 TQ 象限中搜索时间的百分比为和平均经过平台的次数分别为 28.9%, 与 rAAV/CB-A  $\beta_{42}$  肌注免疫组之间也有明显的差异 ( $p < 0.05$ )。而与 rAAV/GFP 组和非处理组之间均没有明显的差异 ( $p > 0.05$ )。同样,在预防组中,如图 10.B 所示, rAAV/CB-A  $\beta_{42}$  免疫的小鼠在 TQ 象限中搜索时间的百分比也均明显高于 rAAV/GFP 组和非处理组 ( $p < 0.05$ )。

如图 11.A 所示, rAAV/CB-A  $\beta_{42}$  肌注免疫组在 30 秒搜索时间内平均经过平台位置的次数为 ( $1.70 \pm 0.35$ ), 明显高于 rAAV/GFP 组 ( $0.49 \pm 0.30$ ) ( $P < 0.01$ ) 和非处理组 ( $0.55 \pm 0.21$ ) ( $P < 0.01$ )。rAAV/A  $\beta_{42}$  肌注免疫组在 30 秒搜索时间内平均经过平台位置的次数为  $0.66 \pm 0.25$ , 与 rAAV/GFP 组

和非处理组之间没有明显的差异(均  $P>0.05$ )，也明显地少于 rAAV/CB-A  $\beta_{42}$  肌注免疫组 ( $P<0.01$ )。各组非转基因小鼠之间 30 秒内在 TQ 象限中搜索时间的百分比和经过平台位置的次数没有明显的差异。

在预防组中，如图 11.B 所示，rAAV/CB-A  $\beta_{42}$  免疫的小鼠在探索实验中经过平台位置的次数也均明显高于 rAAV/GFP 组和非处理组 ( $p<0.05$ )。

### (3) 可见平台水迷宫实验 (Visible water maze)

在做完“probe test”后，我们在平台的上方插一个标志杆，黑白相间，非常醒目，小鼠很容易发现。同时在标志杆的上方放一个白色小球，防止影像示踪系统对标志杆的识别而引起实验终止。可见平台水迷宫实验结果显示，在治疗组中，在第四天时 rAAV/CB-A  $\beta_{42}$  免疫的各组小鼠的平均潜伏期明显的短于其它各组，但是 rAAV/CB-A  $\beta_{42}$  基因重组疫苗的三种免疫途径之间没有明显的差异。如图 12 所示，rAAV/CB-A  $\beta_{42}$  肌肉注射免疫组在第四天的平均潜伏期为  $15.1\pm 1.1s$ ，而 rAAV/GFP 组、非处理组和 rAAV/A  $\beta_{42}$  肌注组分别为  $19.4\pm 3.1s$ 、 $21\pm 3.6s$  和  $19.9\pm 3.3s$ ，经可重复方差分析发现，rAAV/CB-A  $\beta_{42}$  肌肉注射免疫组与 AAV-GFP 组、非处理组和 rAAV/A  $\beta_{42}$  肌注组之间具有显著性差异 ( $P$  值均小于 0.05)。

在预防组中，如图 13 所示，在第四天时 rAAV/CB-A  $\beta_{42}$  免疫的各组小鼠的平均潜伏期与 rAAV/GFP 组和非处理组之间均没有明显的差异，而且 rAAV/CB-A  $\beta_{42}$  基因重组疫苗的三种免疫途径之间没有明显的差异。我们进一步研究发现 PPDAPP 转基因小鼠与非转基因小鼠之间在第 4 天实验中搜索可见平台的平均潜伏期没有明显的差异 ( $P>0.05$ )。

通过这几种水迷宫实验检测发现 rAAV/CB-A  $\beta_{42}$  基因重组疫苗免疫 PDAPP 转基因小鼠与其它各组小鼠相比较，其学习和记忆能力明显地得到改善。

## 实施例 6

### ELISA 检测脑组织中 A $\beta$ 淀粉样蛋白的含量

为了进一步证实 rAAV/CB-A $\beta_{42}$  基因重组疫苗在降低 PDAPP 转基因小鼠脑组织内 A $\beta$  蛋白的作用, 我们采用了非常敏感的 ELISA 方法定量检测小鼠脑组织内人 A $\beta_{40}$  和 A $\beta_{42}$  的含量。此方法可以检测脑组织内总的人 A $\beta_{40}$  和 A $\beta_{42}$  的含量, 包括可溶性和沉淀的。但这种方法不能检测小鼠 A $\beta_{40}$  或 A $\beta_{42}$ , 因此, 在检测非转基因小鼠脑组织提取液时, 无检测信号。检测结果显示, 在治疗组中, rAAV/CB-A $\beta_{42}$  免疫 PDAPP 转基因小鼠脑组织内 A $\beta_{40}$  or A $\beta_{42}$  的含量均明显低于其它各组。rAAV/CB-A $\beta_{42}$  三种免疫途径之间没有明显的差异, 我们以 rAAV/CB-A $\beta_{42}$  肌肉注射组与其它各组进行统计学分析。结果显示, rAAV/CB-A $\beta_{42}$  肌肉注射组脑组织内 A $\beta_{42}$  的平均含量 ( $253.6 \pm 32.7 \text{ ng/g}$  脑组织湿重) 明显低于非处理组 ( $432.8 \pm 51.3 \text{ ng/g}$ )、rAAV/GFP 组 ( $415.9 \pm 61.3 \text{ ng/g}$ ) 和 rAAV/A $\beta_{42}$  肌肉注射组 ( $413.5 \pm 56.1 \text{ ng/g}$ ) ( $p$  值均小于 0.05)。同样, rAAV/CB-A $\beta_{42}$  肌肉注射组脑组织内 A $\beta_{40}$  的平均含量 ( $756.4 \pm 112.5 \text{ ng/g}$ ) 也明显低于非处理组 ( $954.6 \pm 156.3 \text{ ng/g}$ )、rAAV/GFP 组 ( $960.4 \pm 154.9 \text{ ng/g}$ ) 和 rAAV/A $\beta_{42}$  肌肉注射组 ( $925.3 \pm 147.8 \text{ ng/g}$ ) ( $p$  值均小于 0.05)。

同样, 在预防组中, 我们发现 PDAPP 转基因小鼠脑组织内 A $\beta_{40}$  和 A $\beta_{42}$  的含量明显低于治疗组。虽然 rAAV/CB-A $\beta_{42}$  三种免疫途径之间没有明显的差异, 但是 rAAV/CB-A $\beta_{42}$  免疫 PDAPP 转基因小鼠脑组织内 A $\beta_{40}$  和 A $\beta_{42}$  的含量均明显低于其它各组。其中, rAAV/CB-A $\beta_{42}$  肌肉注射免疫组 PDAPP 转基因小鼠脑组织内 A $\beta_{40}$  的含量为  $90.1 \pm 13.2 \text{ ng/g}$ , A $\beta_{42}$  的含量为  $40.2 \pm 10.3 \text{ ng/g}$ , 均明显低于非处理组 (A $\beta_{40}$  为  $130.6 \pm 17.9 \text{ ng/g}$ , A $\beta_{42}$  为  $51.9 \pm 10.2 \text{ ng/g}$ ) 和 rAAV/GFP 组 ( $127.8 \pm 18.6 \text{ ng/g}$ , A $\beta_{42}$  为  $55.3 \pm 13.5 \text{ ng/g}$ ) ( $p$  值均小于 0.05)。

## 实施例 7

## PDAPP 小鼠脑组织内 $\beta$ 淀粉样蛋白免疫组织化学染色

为了进一步研究 PDAPP 转基因小鼠脑组织内  $\beta$  淀粉样蛋白的沉积情况, 我们利用 A $\beta$  特异性单克隆抗体 3D6 (购于美国 Chemicon 公司) 做免疫组织化学染色。如图 14 和图 15 所示, 在治疗组中, 在非处理组 PDAPP 小鼠脑组织的大脑皮质和海马区域均可以看到有明显的  $\beta$  淀粉样蛋白沉积区域, 大量成熟的老年斑。rAAV/CB-A $\beta$  42 免疫组小鼠脑组织内  $\beta$  淀粉样蛋白沉积区域明显减少, 虽然也可以看到老年斑, 但是老年斑的直径明显比非处理组小, 看不到大的老年斑。而 rAAV/GFP 组和 rAAV/A $\beta$  42 组小鼠脑组织内  $\beta$  淀粉样蛋白沉积情况与非处理组之间没有发现明显的差异。我们利用 NIH image J 图像灰度扫描定量分析软件 (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image>) 分析各组 PDAPP 小鼠脑组织内  $\beta$  淀粉样蛋白沉积区域的百分比。结果显示, rAAV/CB-A $\beta$  42 免疫组小鼠脑组织大脑皮质和海马区域  $\beta$  淀粉样蛋白的平均值明显低于非处理组、rAAV/GFP 组和 rAAV/A $\beta$  42 组。如图 16 和图 17 所示, 在预防组中, 在非处理组和 rAAV/GFP 组 PDAPP 小鼠脑组织内也可以看到有明显的  $\beta$  淀粉样蛋白沉积区域, 少量成熟的老年斑, 两组之间没有发现明显的差异, 而 rAAV/CB-A $\beta$  42 免疫组小鼠脑组织内  $\beta$  淀粉样蛋白沉积区域明显减少, 看不到成熟的老年斑。利用图像灰度扫描定量分析各组 PDAPP 小鼠脑组织内  $\beta$  淀粉样蛋白沉积区域的百分比。结果显示, rAAV/CB-A $\beta$  42 免疫组小鼠大脑皮质和海马区域  $\beta$  淀粉样蛋白的平均值明显低于非处理组和 rAAV/GFP 组。

## 实施例 8

### PDAPP 小鼠脑组织刚果红组织学染色

如图 18 和图 19 所示, 在治疗组中, 在非处理组和 rAAV/A $\beta$  42 免疫组 PDAPP 小鼠脑组织的大脑皮质和海马区域均可以看到有大量明显的嗜刚果红神经细胞。rAAV/CB-A $\beta$  42 免疫组小鼠脑组织的大脑皮质和海马区域嗜刚果红神经细胞数目明显减少。表明神经细胞受 A $\beta$  蛋白的损伤明显

减少。同样，在预防组，如图 20 和图 21 所示，rAAV/CB-A $\beta$ <sub>42</sub> 免疫组小鼠脑组织的大脑皮质和海马区域嗜刚果红神经细胞数目比非处理组和 rAAV/GFP 组明显减少。

## 实施例 9

### PDAPP 小鼠脑组织内星形胶质细胞增生状况的免疫组织化学染色

如图 22 所示，在治疗组中，非处理组和 rAAV/A $\beta$ <sub>42</sub> 免疫组 PDAPP 小鼠脑组织大脑皮质均可见到大量明显的 GFAP 阳性星形胶质细胞增生，而 rAAV/CB-A $\beta$ <sub>42</sub> 免疫组 PDAPP 小鼠脑组织内仅有非常弱 GFAP 阳性星形胶质细胞增生。表明脑组织内活化的反应性星形细胞数目减少，脑组织内炎症反应程度降低。同样，在预防组，如图 23 所示，rAAV/CB-A $\beta$ <sub>42</sub> 免疫组小鼠脑组织的大脑皮质 GFAP 阳性星形胶质细胞数目比非处理组和 rAAV/GFP 组明显减少。

## 实施例 10

### CB-A $\beta$ <sub>42</sub> 和 A $\beta$ <sub>42</sub> 蛋白在原核细胞中的表达与纯化

首先，通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增 CB-A $\beta$ <sub>42</sub> 和 A $\beta$ <sub>42</sub> DNA 片段 (具体步骤同实施例 1)，并将它们分别装入 pET30a (Novagen 公司产品) 和 pET42a (Novagen 公司产品) 原核表达载体中。然后，转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达菌株中，通过 IPTG 诱导，可以得到融合蛋白。将融合蛋白通过 His Trap 纯化柱加以纯化，然后，用凝血酶 Xa 因子分别将 CB-A $\beta$ <sub>42</sub> 蛋白和 A $\beta$ <sub>42</sub> 肽片段切割下来，并加以纯化，冻干后，-20℃ 保存。

## 实施例 11. CB-A $\beta$ <sub>42</sub> 蛋白和 A $\beta$ <sub>42</sub> 肽免疫原性的检测

将实施例 10 获得的冻干的 CB-A $\beta$ <sub>42</sub> 蛋白和 A $\beta$ <sub>42</sub> 肽分别溶于磷酸盐缓冲液 (PBS) 中，在无佐剂的情况下，皮下免疫 Balb/c 小鼠，结果显示，在免疫一个月后，CB-A $\beta$ <sub>42</sub> 蛋白免疫组可以产生高滴度的抗  $\beta$  淀粉样蛋白

抗体（抗体滴度为 1: 10,000 ~ 20,000），而 A $\beta$ <sub>42</sub> 肽免疫组仅产生非常低的抗  $\beta$  淀粉样蛋白抗体（抗体滴度为 1: 200 ~ 500）。由此表明 CB-A $\beta$ <sub>42</sub> 蛋白也能够作为预防和治疗阿尔茨海默病的药物。

## 权 利 要 求

1. 一种用于治疗 and 预防阿尔茨海默病的基因重组疫苗, 该疫苗含有编码霍乱毒素 B 亚单位和 A $\beta$ 肽片段的融合蛋白的重组 DNA 分子。

2. 如权利要求 1 所述的基因重组疫苗, 其中还含有与该重组 DNA 分子有效连接的并能够在真核细胞中表达融合蛋白的启动子, 以及位于所述重组 DNA 分子的 5'端编码 N-末端信号肽的前导序列。

3. 如权利要求 1 所述的基因重组疫苗, 其中所述 A $\beta$ 肽片段选自 A $\beta_{39}$ 、A $\beta_{40}$ 、A $\beta_{41}$ 、A $\beta_{42}$  和 A $\beta_{43}$ 。

4. 一种重组 DNA 分子, 其含有编码霍乱毒素 B 亚单位和 A $\beta$ 肽片段的融合蛋白的 DNA 分子, 以及与该 DNA 分子有效连接的并能够在真核细胞中表达融合蛋白的启动子, 和位于所述 DNA 分子的 5'端编码 N-末端信号肽的前导序列。

5. 一种重组 DNA 分子, 其含有如下的 DNA 序列;

(1) SEQ ID NO. 1 所示的 DNA 序列;

(2) 在严格条件下与 SEQ ID NO. 1 所示的 DNA 序列杂交的 DNA 序列。

6. 如权利要求 5 所述的重组 DNA 分子, 其中编码霍乱毒素 B 亚单位和 A $\beta$ 肽片段的融合蛋白的核苷酸序列如图 4 所示, 所述启动子为 CMV 启动子, 所述前导序列为霍乱毒素 B 亚单位的前导序列。

7. 一种融合蛋白, 其含有如下的氨基酸序列:

(1) SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列;

(2) 通过一个或多个氨基酸残基的替换、缺失或添加而衍生自 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列并具有与其相同功能的氨基酸序列。

8. 一种融合蛋白, 其从 N 端至 C 端由霍乱毒素 B 亚单位、接头 A $\beta$ 肽片段和 A $\beta$ 肽片段组成, 所述 A $\beta$ 肽片段选自 A $\beta_{39}$ 、A $\beta_{40}$ 、A $\beta_{41}$ 、A $\beta_{42}$  和 A $\beta_{43}$ , 所述接头的氨基酸序列为甘氨酸-脯氨酸-甘氨酸-脯氨酸。



9. 如权利要求 8 所述的融合蛋白, 其具有 SEQ ID NO. 2 所示序列。

10. 一种重组病毒载体, 其包含权利要求 4-6 任一项的重组 DNA 分子, 所述病毒载体选自腺相关病毒、腺病毒、疱疹病毒、逆转录病毒、痘苗病毒、禽痘病毒、新培斯病毒或鸡痘病毒。

11. 如权利要求 10 所述的重组病毒载体, 其为包含权利要求 6-8 任一项的重组 DNA 分子的腺相关病毒。

12. 一种药物组合物, 其包含权利要求 6-8 任一项的重组 DNA 分子及合适的基因转运载体。

13. 一种药物组合物, 其包含权利要求 7-9 任一项的融合蛋白及药理学可接受的载体。

14. 权利要求 6-8 任一项的重组 DNA 分子或者权利要求 7-9 任一项的融合蛋白在制备治疗和预防阿尔茨海默病的药物中的应用。

15. 一种预防和 / 或治疗阿尔茨海默病的方法, 该方法包括给需要该治疗的患者服用权利要求 1 - 3 的基因重组疫苗或者权利要求 7-9 任一项的融合蛋白。

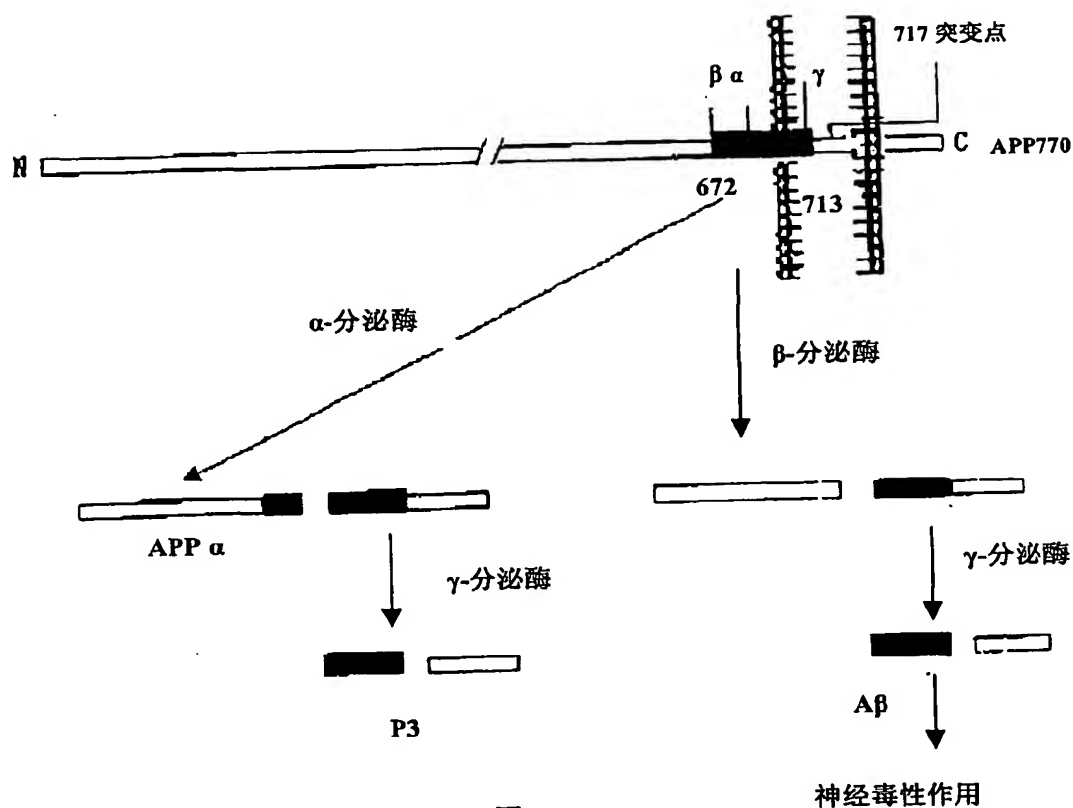


图 1

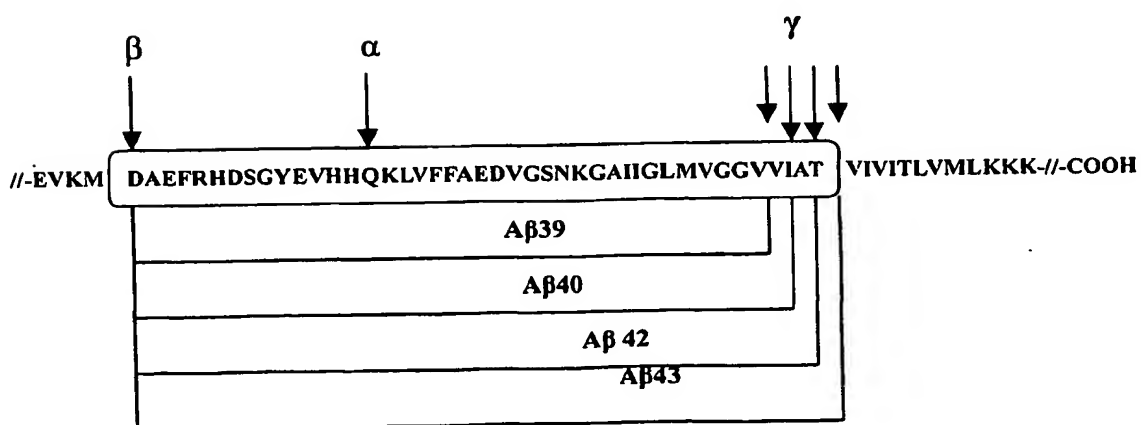


图 2

图 3

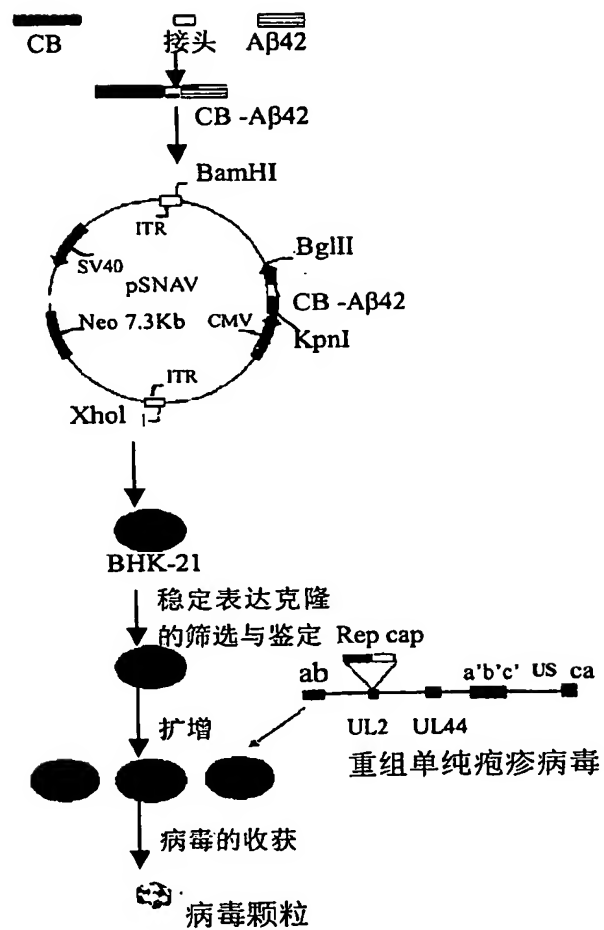


图 4

5' ATGATTAAAT	TAAAATTGG	TGTTTTTTT	ACAGTTTAC
TATCTTCAGC	ATATGCACAT	GGAACACCTC	AAAATAATAC
TGATTTGTCT	GCAGAATACC	ACAACACACA	AATACATAAC
CTAAATGATA	AGATATTTTC	GTATACAGAA	TCTCTAGCTG
GAAAAAGAGA	GATGGCTATC	ATTACTTTTA	AGAATGGTGC
AACTTTTCAA	GTAGAAGTAC	CAGGTAGTCA	ACATATAGAT
TCACAAAAAA	AAGCGATTGA	AAGGATGAAG	GATACCTGCA
GGATTGCATA	TCTTACTGAA	GCTAAAGTCG	AAAAGTTATG
TGTATGGAAT	AATAAAACGC	CTCATGCGAT	TGCCGCAATT
AGTATGGCAA	ATGGTCCTGG	TCCTGATGCA	GAATTCCGAC
ATGACTCAGG	ATATGAAGTT	CATCATCAAA	AATTGGTGT
CTTTGCAGAA	GATGTGGGTT	CAAACAAAGG	TGCAATCAAT
GGACTCATGG TGGCGGTGT TGTCATAGCG-3'			

图 5

M I K L K F G V F F T V L L S S A Y A H G T P Q  
 N I T D L C A E Y H N T Q I H T L N D K I F S Y  
 T E S L A G K R E M A I I T F K N G A T F Q V E  
 V P G S Q H I D S Q K K A I E R M K D T L R I A  
 Y L T E A K V E K L C V W N N K T P H A I A A I  
 S M A N G P G P D A E F R H D S G Y E V H H Q  
 K L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V  
 V I A

图 6A

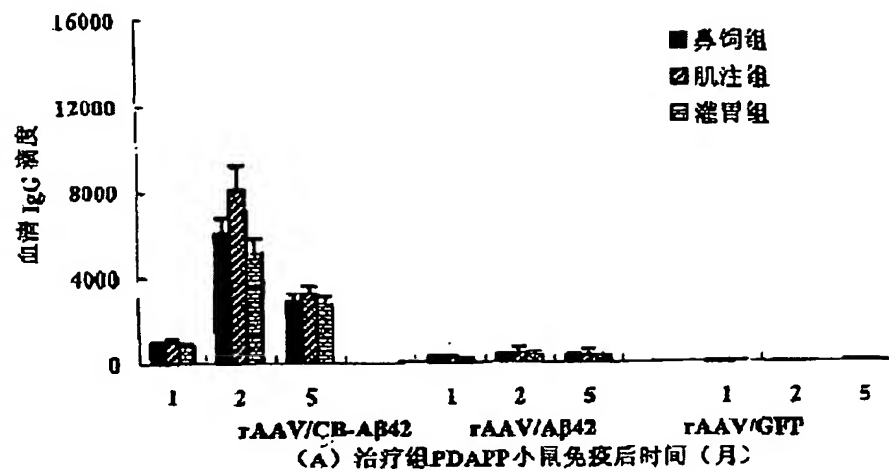


图 6B

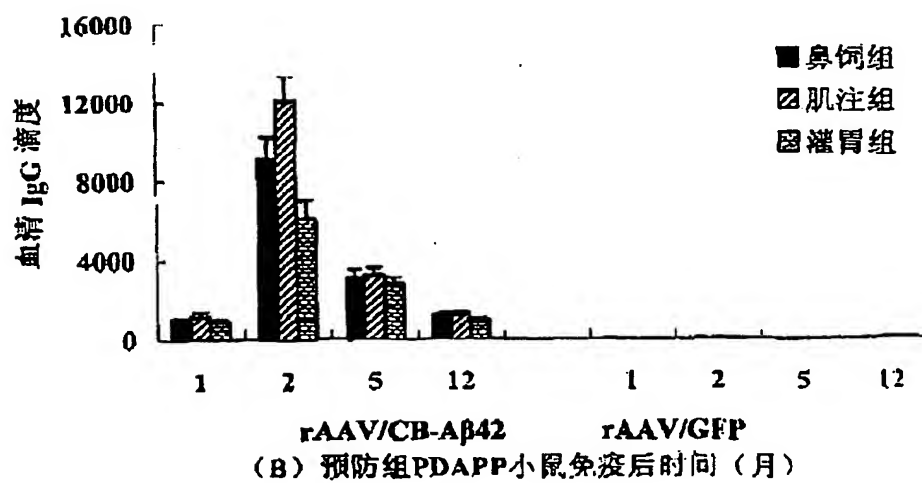


图 6C

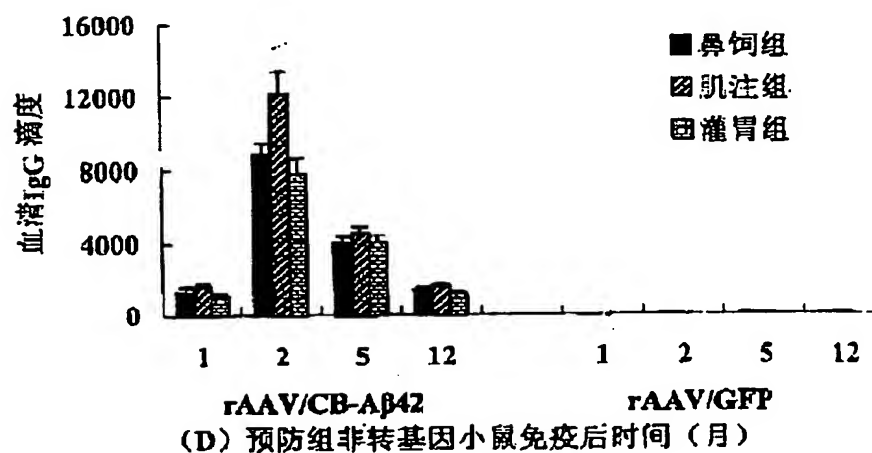
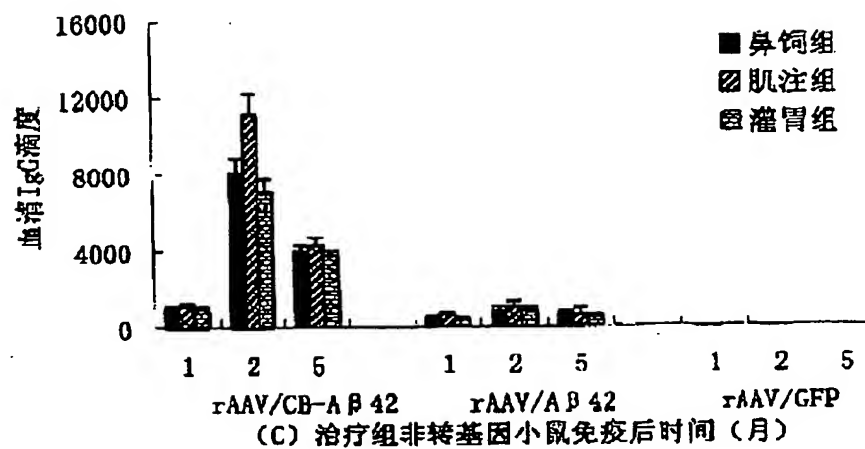


图 6D

图 7

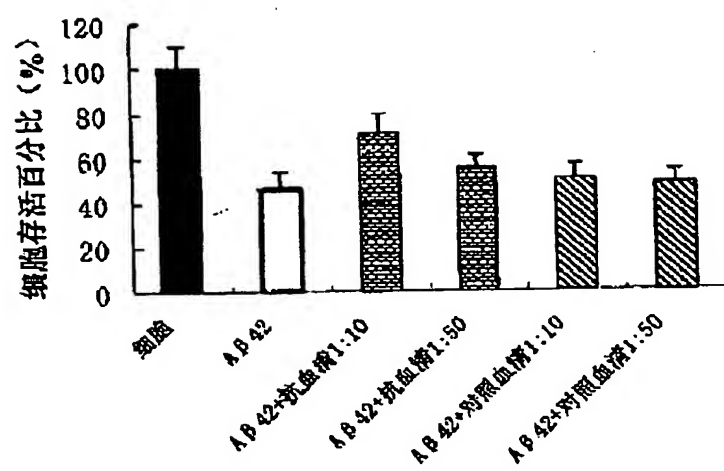


图 8

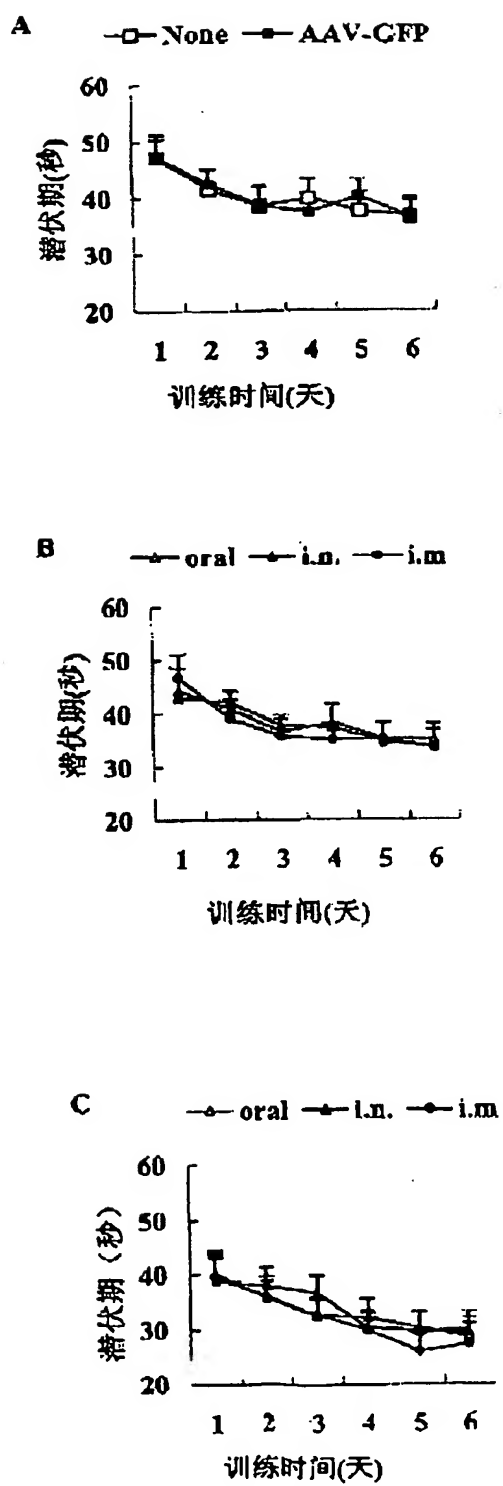




图 9

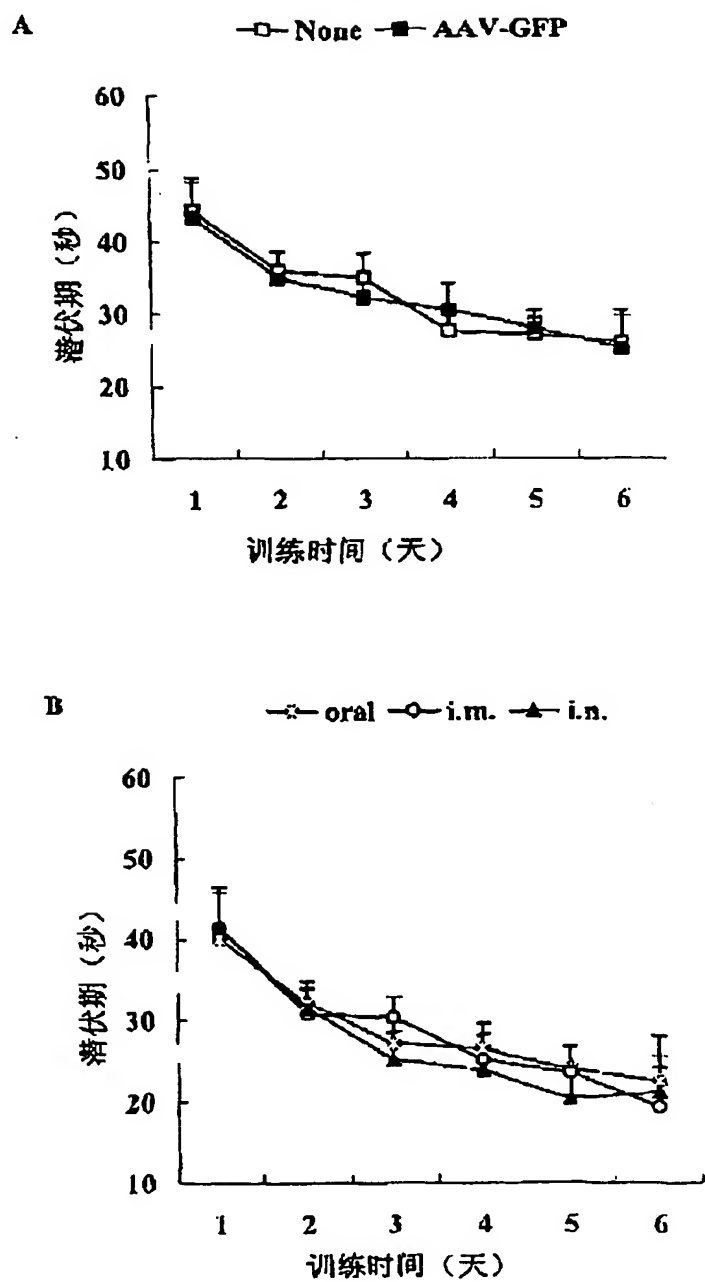


图10

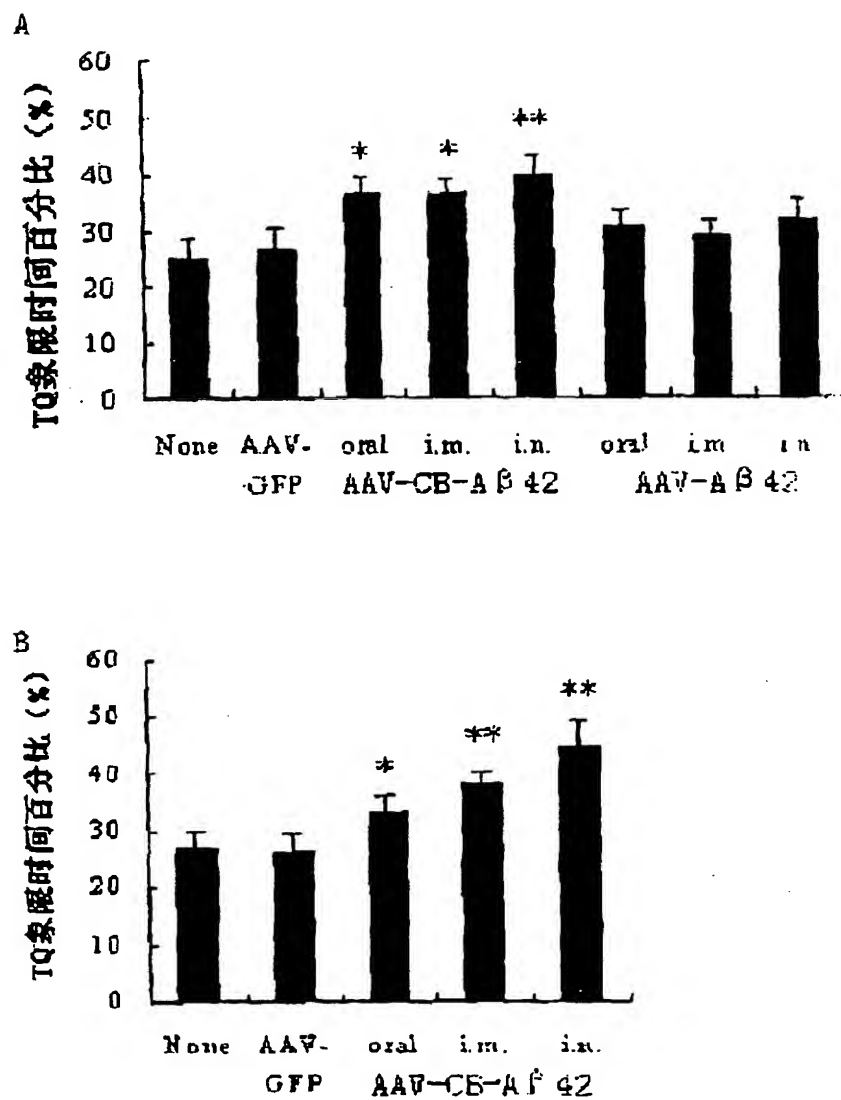


图 11

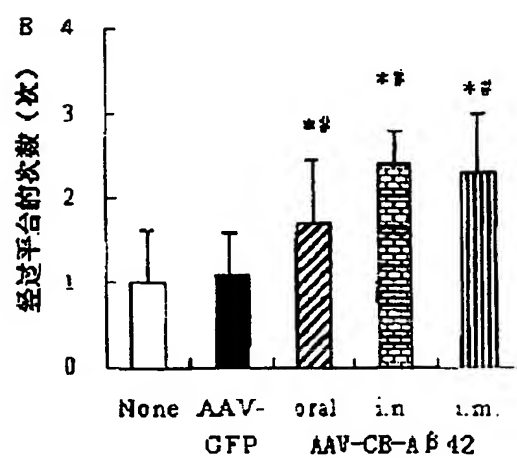
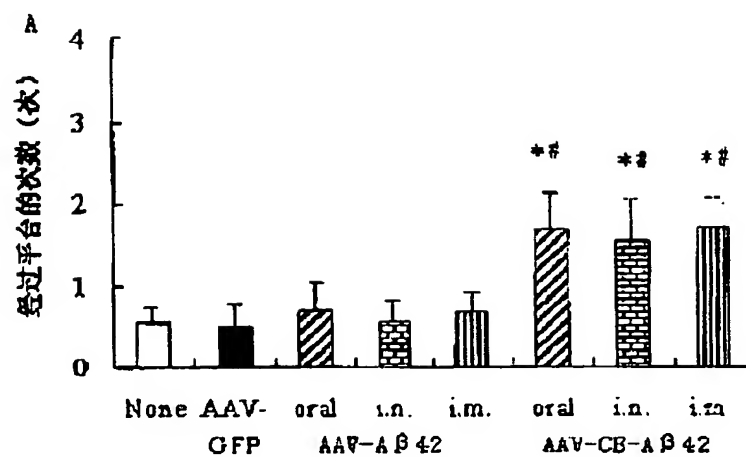
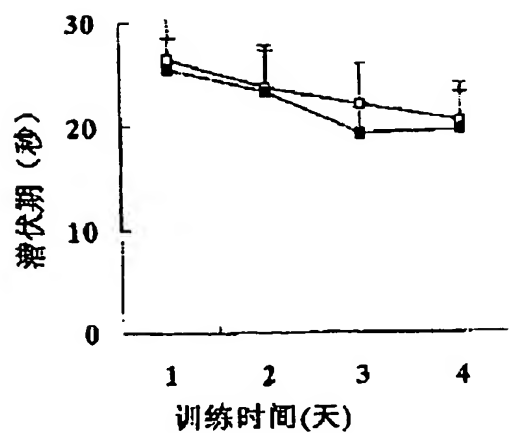
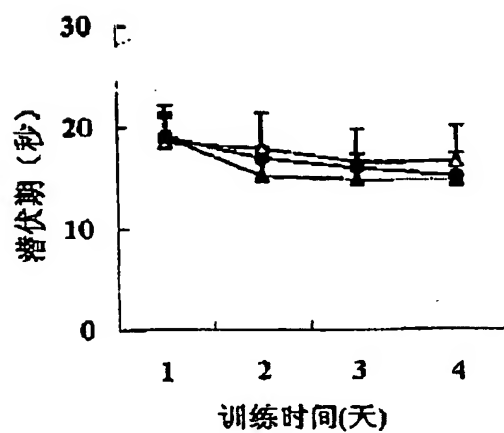


图 12

A —○— None —■— AAV-GFP (i.m.)



B —△— oral —▲— i.n. —●— i.m.



C —△— oral —▲— i.n. —●— i.m.

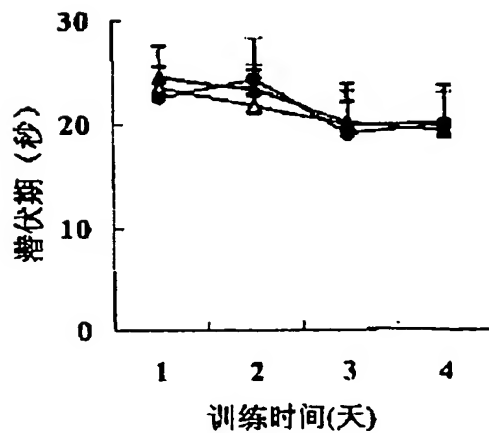


图 13

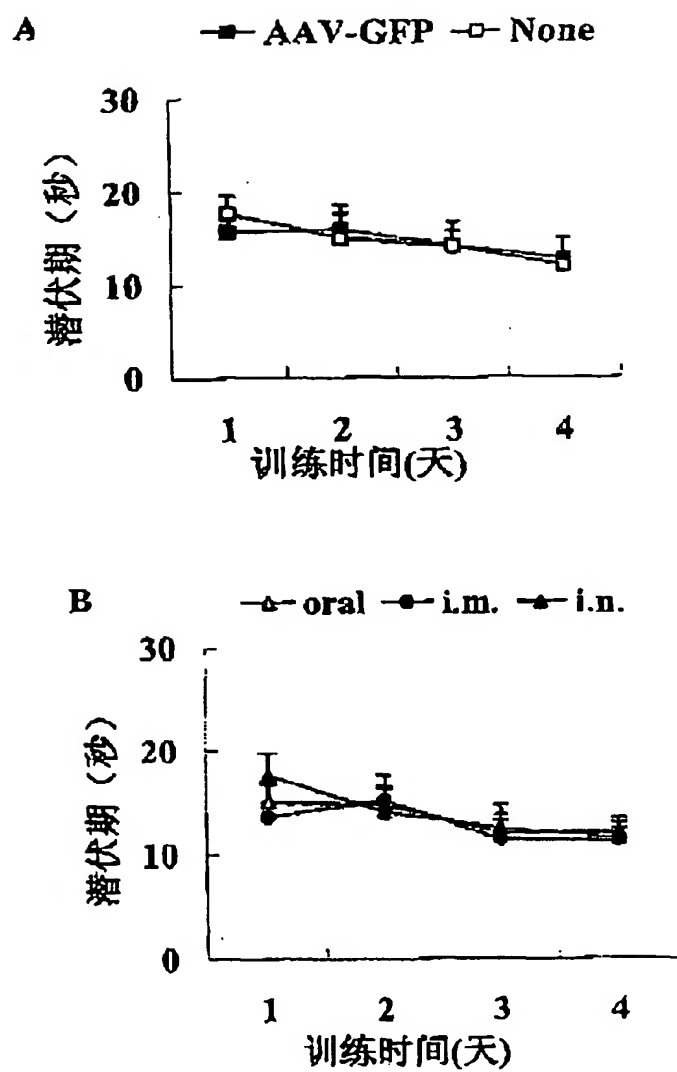


图 14

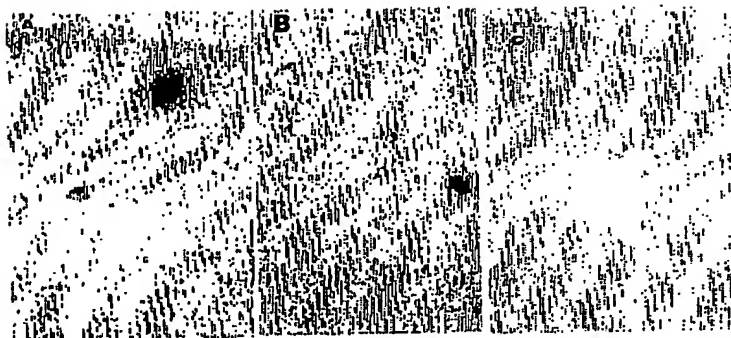


图 15

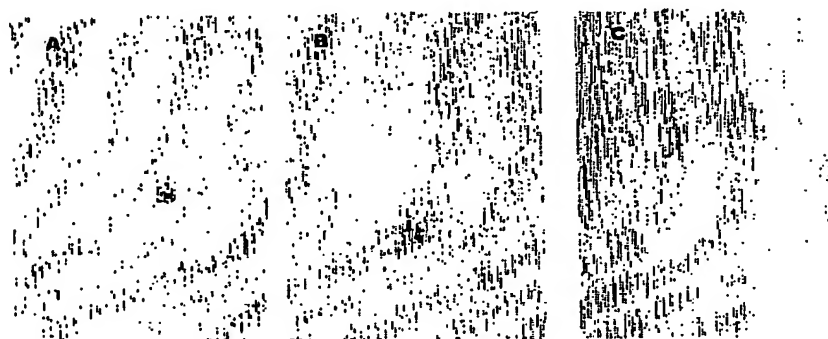


图 16



图 17

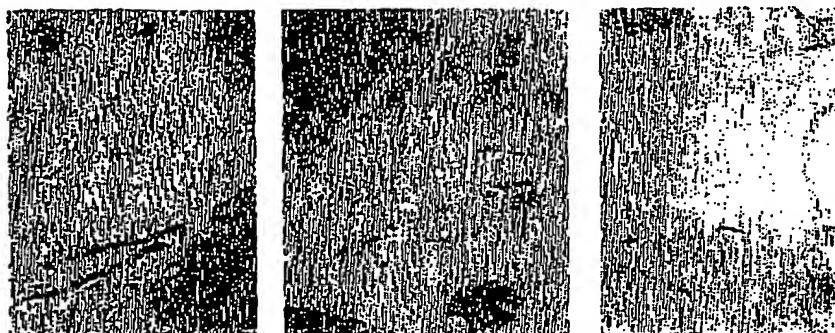


图 18.

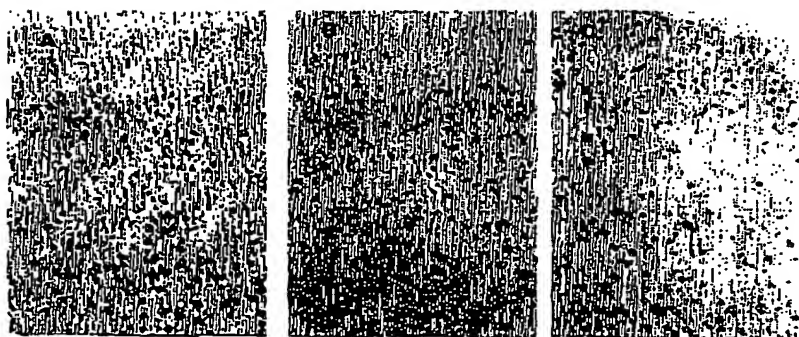


图 19.



图 20.

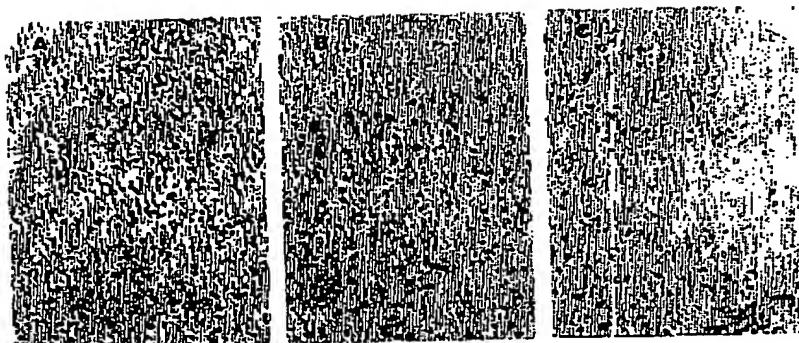


图 21.

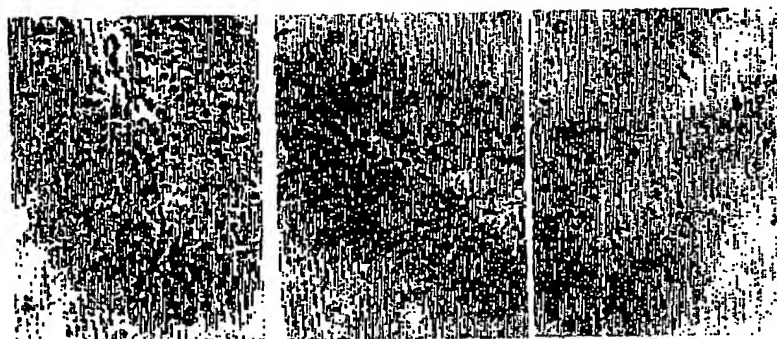
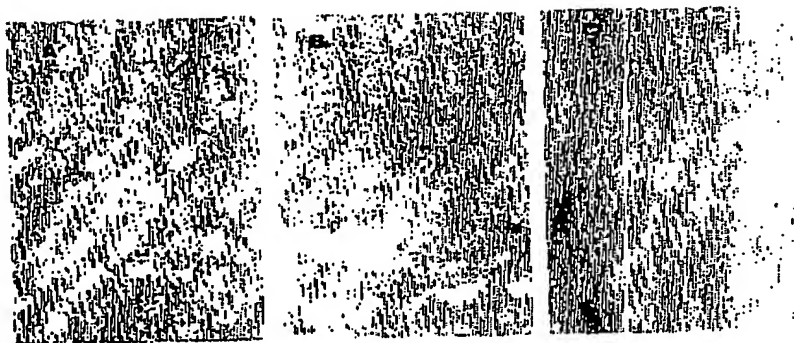


图 22.





图 23



IAP13 Rec'd PCT/PTO 12 DEC 2005  
 序列表

<110> 本元正阳基因技术股份有限公司

<120> 用于治疗 and 预防阿尔茨海默病的重组腺相关病毒基因疫苗及其用途

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 510

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码霍乱毒素 B 亚单位和 A $\beta$ 肽片段的融合蛋白的基因

<400> 1

atgattaaat taaaatttgg tgtttttttt acagttttac tatcttcagc atatgcacat	60
ggaacacctc aaaatattac tgatttgtgt gcagaatacc acaacacaca aatacatagc	120
ctaaatgata agatattttc gtatacagaa tctctagctg gaaaaagaga gatggctatc	180
attactttta agaatggtgc aacttttcaa gtagaagtac caggtagtca acatatagat	240
tcacaaaaaa aagcgattga aaggatgaag gataccctga ggattgcata tcttactgaa	300
gctaaagtcg aaaagttatg tgtatggaat aataaaacgc ctcatgcgat tgccgcaatt	360
agtatggcaa atggctcctgg tcctgatgca gaattccgac atgactcagg atatgaagtt	420
catcatcaaa aattggtgtt ctttgcagaa gatgtgggtt caaacaagg tgcaatcatt	480
ggactcatgg tgggcggtgt tgcatagcg	510

<210> 2

<211> 170

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 霍乱毒素 B 亚单位和 A $\beta$ 肽片段的融合蛋白

<400> 2

Met Ile Lys Leu Lys Phe Gly Val Phe Phe Thr Val Leu Leu Ser	
1	15
Ser Ala Tyr Ala His Gly Thr Pro Gln Asn Ile Thr Asp Leu Cys	
20	30
Ala Glu Tyr His Asn Thr Gln Ile His Thr Leu Asn Asp Lys Ile	
35	45

Phe Ser Tyr Thr Glu Ser Leu Ala Gly Lys Arg Glu Met Ala Ile  
                   50                                  55                                  60  
 Ile Thr Phe Lys Asn Gly Ala Thr Phe Gln Val Glu Val Pro Gly  
                   65                                  70                                  75  
 Ser Gln His Ile Asp Ser Gln Lys Lys Ala Ile Glu Arg Met Lys  
                   80                                  85                                  90  
 Asp Thr Leu Arg Ile Ala Tyr Leu Thr Glu Ala Lys Val Glu Lys  
                   95                                  100                                 105  
 Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys Thr Pro His Ala Ile Ala Ala Ile  
                   110                                 115                                 120  
 Ser Met Ala Asn Gly Pro Gly Pro Asp Ala Glu Phe Arg His Asp  
                   125                                 130                                 135  
 Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu  
                   140                                 145                                 150  
 Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly  
                   155                                 160                                 165  
 Gly Val Val Ile Ala  
                   170

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 用于人的 A $\beta$  42 的上游引物

&lt;400&gt; 3

GGTCCTGGTC CTGATGCAGA ATTCCGACAT G 31

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 用于人的 A $\beta$  42 的下游引物

&lt;400&gt; 4

GGAAGATCTT TACTACGCTA TGACAACACC GCCC 34

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

<220>

<223> 用于霍乱毒素 B 亚单位的上游引物

<400> 5

CCGGGGTACC CCACCATGAT TAAATTAAAA TTTGGTG 37

<210> 6

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于霍乱毒素 B 亚单位的下游引物

<400> 6

CTGCATCAGG ACCAGGACCA TTGCCATAC TAATTGCG 38

<210> 7

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于 CB 与 A $\beta$ <sub>42</sub> DNA 间的接头 DNA

<400> 6

GGTCCTGGTC CT 12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN03/01019

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/62,15/63,15/33 A61K39/385 A61P25/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

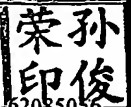
WPI,PAJ,CNPAT,NPL,CNKI

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 1281366 T (NEURALAB LTD) 24 January 2001(24.01.01) the whole document,especially pages 11-14 18	1-15
Y	CAO,CHENG ETAL: "CONSTRUCTION OF CHOLERA TOXIN B SUBUNIT GENE FUSION SYSTEM" CHINESE BIOCHEMICAL JOURNAL VOL.10,NO.5 ,OCT.,1994(10.94) pages 579-583, the whole document	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 17.DEC.2003(17.12.03)	Date of mailing of the international search report 05.FEB 2004 (05.02.2004)
Name and mailing address of the ISA/CN 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer  Telephone No. 86-10-62035036

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN03/01019

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LI MING-FENG ETAL "A CANDIDATE ORAL VACCINE TO HELICOBACTER PYLORI:FUSION PROTEIN OF HspA AND CtxB" ACTA BIOCHIMICA et BIOPHYSICA SINICA VOL.33,NO.3, MAY.2001(05.01) pages 360-364,the whole document	1-15
P,Y	WO 02/098368 A2 (REEN,BRUCE,A ETAL) 12.DEC.2002(12.12.02) claims 12-13,32-33 pages 39-40	1-15

---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.  
PCT/CN03/01019

---

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN1281366 T	24-01-2001	CA 2312920 A	10-06-1999
		WO 9927944 A	10-06-1999
		EP 1033996 A	13-09-2000
		DE 1033996 T	07-06-2001
		AU 1706199 A	16-06-1999
		ZA 9810932 A	02-07-1999

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN03/01019

A. 主题的分类

IPC7 C12N15/62,25/63,15/33 A61K39/385 A61P25/28

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

C12N A61K A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI,PAJ,CNPAT,NPL,CNKI

C. 相关文件

类 型\*

引用文件, 必要时, 指明相关段落

相关的权利要求编号

Y CN 1281366 T (NEURALAB LTD) 1-15  
2001 年 1 月 24 日 (24.01.01)  
全文, 尤其说明书 11-14 页, 18 页,

Y 曹诚 等: “霍乱毒素 B 亚基融合蛋白表达系统地构建” 1-15  
生物化学杂志,  
第 10 卷第 5 期, 1994 年 10 月 (10.94)  
第 579-583 页, 全文

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

\* 引用文件的专用类型:

“A” 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利

“L” 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

17. 12 月 2003 (17. 12. 03)

国际检索报告邮寄日期

0 5 · 2 月 2004 (0 5 · 0 2 · 2 0 0 4)

国际检索单位名称和邮寄地址

ISA/CN

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号: 86-10-62019451

授权官员

荣孙  
印俊

电话号码: 86-10-62085056



国际检索报告

国际申请号  
PCT/CN03/01019

C(续). 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
Y	李明峰 等, “幽门螺杆菌 HspA 融合蛋白口服液疫苗的构建” 生物化学与生物物理学报, 第 33 卷第 3 期, 2001 年 5 月 360-364 页, 全文	1-15
P,Y	WO 02/098368 A2 (REEN,Bruce,A ;HOLMES,Randall,K.;JOBLING,Mic hael;ZHU,Duzhang;AMERICAN CYANAMID COMPANY; UNIVERSITY OF COLORADO) 2002 年 12 月 12 日(12.12.02) 权利要求 12-13, 32-33, 说明书 39 页 26 行-40 页 13 行	1-15

国际检索报告  
关于同族专利成员的情报

国际申请号  
PCT/CN03/01019

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
CN 1281366 T	24-01-01	CA 2312920 A	10.06.99
		WO 9927944 A	10.06.99
		EP 1033996 A	13.09.00
		DE 1033996 T	07.06.01
		AU 1706199 A	16.06.99
		ZA 9810932 A	02.07.99

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**